

***Metodología DBD-FISH: Estudio  
de la estructura cromatínica y  
del daño radioinducido***



**María Teresa Rivero Gil**



**2005**

Universidad de La Coruña

Centro Oncológico de Galicia

# ***Metodología DBD-FISH: Estudio de la estructura cromatínica y del daño radioinducido***



Universidad de La Coruña

**María Teresa Rivero Gil**

**2005**



**Centro Oncológico  
de Galicia**

JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ GARCÍA, Doctor en Medicina y Cirugía, jefe del Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia, y médico de la Sección de Genética y Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Juan Canalejo

INFORMA QUE:

El presente trabajo, ***“Metodología DBD-FISH: Estudio de la estructura cromatínica y del daño radioinducido”***, de la Licenciada en Ciencias Biológicas María Teresa Rivero Gil, ha sido realizado bajo mi dirección en el Centro Oncológico de Galicia y el Complejo Hospitalario Juan Canalejo, considerándolo en condiciones para optar al Grado de Doctor en Biología, y autorizándolo para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firman este documento en La Coruña a 28 de Enero de 2005.



Fdo. José Luis Fernández García  
Director de la Tesis Doctoral



Fdo. Horacio Naveira Fachal  
Tutor de la Tesis Doctoral

*A Rubén, a mi familia,.....*



### **Agradecimientos:**

A **José Luis Fernández**, mi gratitud por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo y mi admiración por su capacidad de trabajo.

A **Horacio Naveira**, gracias por el trato amable recibido y por facilitarme el trabajo.

A todos **mis compañeros del laboratorio**, a Arantxa, por la facilidad de palabra, a Alejandro y Raquel, por el sentido del humor, a Belén, por los ideales, a Lourdes, por “guay”, a Susana, por la sonrisa; y a los que por él han pasado (Fernando, Silvia A, Silvia R,.....), mi profundo agradecimiento por vuestra compañía y por todos los momentos vividos.....

Al personal de los servicios de **Radioterapia** (Carlos, José María, Begoña, Cristina, Loli,.....), de **Informática** (Diego, José Luis, Manuel), y del Laboratorio de **Hematología** del Centro Oncológico de Galicia, que gracias a su ayuda han hecho posible la realización de este trabajo.

A la sección de **Genética del Materno Infantil** del Complejo Hospitalario Juan Canalejo, a Vicente Goyanes, mi gratitud y admiración por las enseñanzas recibidas. A Asunción, Berta, Cristina, Elisa, José Antonio, Rosa,....., por el trato dispensado, que hizo el trabajo más agradable. Gracias.

A **Asunción Díez** y **José Luis Butragueño**, del Consejo de Seguridad Nuclear (CSN), mi agradecimiento por el apoyo a este trabajo.

Y, mi eterna gratitud, a todo aquello que me ha ayudado y me ayuda a seguir mi camino.....

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.*

A. Einstein.

# *Índice*

## ÍNDICE:

<b>Glosario</b>	1
<b>Introducción</b>	
Las secuencias repetitivas del ADN	7
Efectos de la radiación en el ADN	21
Mecanismos de reparación del ADN	26
-Reparación por excisión de nucleótidos (NER)	27
-Reparación por excisión de bases (BER)	29
-Recombinación homóloga (HR)	31
-Unión de extremos no homólogos (NHEJ o EJ)	31
<b>Técnicas de detección y cuantificación de las roturas del ADN</b>	36
<i>Técnicas bioquímicas</i>	36
-Sedimentación en gradiente de sacarosa (neutra o alcalina)	36
-Elución neutra o alcalina	37
-Desnaturalización alcalina del ADN y cromatografía de hidroxipatita	37
<i>Técnicas de genética molecular</i>	38
-Desnaturalización alcalina / Southern blot	38
-Electroforesis de campo pulsante en gel de agarosa / Southern blot	39
<i>Técnicas morfológicas</i>	40
-Traslado de mella "In situ"	40
-Exonucleasa III-Random Priming	40
-TUNEL o marcaje enzimático en extremo de rotura	41
-Técnica del halo neutro	41
-Electroforesis en microgel ó Ensayo de cometas	41
-DBD-FISH (DNA Breakage Detection-FISH)	44
<i>Técnicas citogenéticas</i>	46
-Aberraciones cromosómicas estructurales	46
-La Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)	47
-PCC (Cromosomas Condensados Prematuramente)	48
-Técnica de los micronúcleos	48
-Intercambio de cromátidas hermanas: SCEs	49

## Objetivos

1. Estudio de los lugares lábiles alcalinos constitutivos en el genoma de ratón mediante DBD-FISH	53
2. Evaluación de las roturas de cadena sencilla y doble en el ADN mediante DBD-FISH	53
3. Patrones de migración del ADN en electroforesis de células aisladas, incluidas en microgel, en dos dimensiones	54
4. Reparación de las secuencias teloméricas intersticiales en células de hámster chino normales y deficientes en la reparación de roturas de cadena doble del ADN	54

## Material y Métodos

Material	57
-Reactivos y equipo técnico	57
-Soluciones	57
-Enzimas	58
-Sondas de ADN	58
Métodos	60
<i>1. DBD-FISH</i>	60
-Gelificación de los portaobjetos	60
-Preparación de la muestra	61
-Formación de los microgeles	62
-Inducción del daño en el ADN	62
-Neutralización y lisis	63
-Lavado	64
-Electroforesis	64
-Unwinding alcalino	65
-Neutralización	65
-Lavados y deshidratación	65
-Hibridación con sondas de ADN	68
-Lavado de sondas	69
-Detección de las sondas	70
-Tinción nucleoides y visualización al microscopio	71
-Obtención de las imágenes	71

-Análisis de las imágenes	72
-Análisis estadístico	74
<b>2. FISH en metafases</b>	74
-Preparación de la muestra	74
-Desnaturalización	75
-Hibridación	75
-Lavado	75
-Detección de sondas	76
-Tinción de los cromosomas y visualización al microscopio	76
<b>3. Marcaje de regiones de ADN desapareado</b>	76
<b>Resultados y Discusión</b>	
<b>1. Estudio del ADN satélite principal de ratón mediante DBD-FISH</b>	81
Artículo:	
Rivero MT, Vázquez-Gundín F, Goyanes V, Campos A, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. High frequency of constitutive alkali-labile sites in mouse major satellite DNA, detected by DNA breakage detection-fluorescence <i>in situ</i> hybridization. <b>Mutation Research</b> , 483: 43-50 (2001).	93
<b>2. Evaluación de las roturas de cadena sencilla y doble en el ADN mediante DBD-FISH</b>	95
Artículo:	
Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT, Genescá A, Gosálvez J, Goyanes V. DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and double- strand breaks in individual cells. <b>Experimental Cell Research</b> , 270: 102-109 (2001).	109
<b>3. Patrones de migración del ADN en electroforesis de células aisladas, incluidas en microgel, en dos dimensiones</b>	111



Artículo:

Rivero MT, Vázquez-Gundín F, Muriel L, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Patterns of DNA migration in two-dimensional single-cell gel electrophoresis analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 42: 223-227 (2003).

121

4. Reparación de las secuencias teloméricas intersticiales en células de hámster chino normales y deficientes en la reparación de roturas de cadena doble del ADN

123

Artículo:

Rivero MT, Mosquera A, Goyanes V, Slijepcevic P, Fernández JL. Differences in repair profiles of interstitial telomeric sites between normal and DNA double-strand break repair deficient Chinese hamster cells. **Experimental Cell Research**, 295: 161-172 (2004).

141

**Conclusiones**

143

**Bibliografía**

149

# ***Glosario***

ADNcd: ADN de cadena doble

ADNcs: ADN de cadena sencilla

AP: sitio apurínico/apirimidínico

BER: “Base excision repair”. Reparación por excisión de bases

BrdU: bromodeoxiuridina

BD-FISH: “DNA Breakage Detection-FISH”. Detección de roturas de ADN mediante hibridación “in situ” fluorescente

dsb: “double strand break”. Rotura de cadena doble

EJ: “end joining”. Unión de extremos

FISH: hibridación “in situ” fluorescente

HR: “homologous recombination”. Reparación por recombinación homóloga

ITRS: “interstitial telomeric repeat sequence”. Secuencia repetitiva telomérica intersticial

ITs: “interstitial telomeric sequence”. Secuencias teloméricas intersticiales

kb: kilobases

LET: transferencia lineal de energía

LINES: elementos largos nucleares dispersos

NER: “nucleotide excision repair”. Reparación por excisión de nucleótidos

NHEJ: “non homologous end joining”. Unión de extremos no homólogos

pb: pares de bases

PCC: condensación prematura de cromosomas

SCE: Intercambio de cromátidas hermanas

SCGE: electroforesis en gel en células aisladas. Ensayo de cometas

SINES: elementos cortos nucleares dispersos

ssb: rotura de cadena sencilla

TCR: “Transcription-Coupled Repair”. Reparación acoplada a la transcripción.

TdT: desoxinucleótido transferasa terminal

TUNEL: “TdT-mediated dUTP Nick End Labeling”. Marcaje de mellas terminales mediado por TdT

# *Introducción*

## **LAS SECUENCIAS REPETITIVAS DEL ADN**

A nivel molecular, en el genoma de eucariotas podemos encontrar secuencias de ADN con diferentes grados de repetición. Esto se ha podido detectar mediante estudios cinéticos de reasociación, donde se ha visto que los genomas complejos, como el de los humanos, poseen diferentes tipos de secuencias en relación con el número de copias. Estos estudios se realizan mediante fragmentación del ADN, donde los fragmentos obtenidos se desnaturalizan con calor, para posteriormente bajar la temperatura a unos 20-30°C por debajo de su  $T_m$  (temperatura en la que la mitad del ADN se encuentra en forma de cadena sencilla), permitiendo su renaturalización. La tasa de renaturalización dependerá de la concentración inicial de la secuencia en concreto y del tiempo (Strachan, 1999). En el genoma humano se encuentran tres grandes grupos de ADN en cuanto a la abundancia del número de copias:

1. **Secuencias de ADN de copia única** (una o pocas copias). Se encuentran los genes que codifican proteínas.
2. **Secuencias de ADN moderadamente repetidas** ( $10^2$  - $10^4$  copias). Se encuentran los genes que codifican para ARN ribosómico, ARN transferente y genes que codifican la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.
3. **Secuencias de ADN altamente repetidas** ( $> 10^5$  copias) (Fig. 1) (Hood et al., 1975). Dentro de este grupo se puede realizar la siguiente clasificación:

### **3.1. ADN repetido en tándem.**

Secuencias de ADN repetidas en tándem, es decir, unas a continuación de las otras. Dentro de este grupo y atendiendo a la longitud de las unidades de repetición se pueden diferenciar:

#### **3.1.1. ADN satélite.**

En el ADN satélite humano se pueden diferenciar mediante gradiente de densidad cuatro tipos, denominados ADN satélite I, II, III y IV. La fracción total

de este ADN representa el 6 % del genoma (Corneo et al., 1973) y se les conoce con el nombre de **satélites clásicos**. Experimentos de hibridaciones cruzadas de las cuatro fracciones de ADN satélite sugirieron la presencia de familias con secuencias comunes (Mitchell et al., 1979). Los satélites III y IV son difíciles de diferenciar entre sí debido a su homología. En cada una de estas clases de ADN satélite se encuentran diferentes familias de secuencias de ADN repetidas en tándem, que pueden ser compartidas entre diferentes clases.

El satélite **clásico I** es la fracción más rica en AT (72,4%) y es el satélite clásico menos frecuente (Jones et al., 1974, Gosden et al., 1975, y Mitchell et al., 1979). Estudios bioquímicos han demostrado que este ADN satélite está formado por dos fracciones diferentes, el satélite 1 (número arábigo) y la familia DYZ2. El satélite 1 (S.1) está compuesto por dos unidades alternantes de 17 y 25 pb repetidas en tándem (Proser et al., 1986). Se localiza en regiones pericentroméricas de los cromosomas 3, 4 y también en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22).

Los **satélites clásicos II y III** están formados por variantes de la repetición básica de 5 pb (5'-TTCCA-3'). Mediante mapeo de restricción se han encontrado subfamilias que presentan diferentes unidades de repetición de orden superior, que parecen superponerse con la unidad de repetición básica. Se piensa que estas subfamilias surgen como resultado de una amplificación subsecuente de una unidad que es más larga que la unidad de repetición básica y que contiene algunos nucleótidos divergentes (Strachan et al., 1999). Estos satélites se localizan principalmente en la heterocromatina yuxtacentromérica de los cromosomas 1, 9, 16 y en el brazo largo del cromosoma Y (Moyzis et al., 1987; Jeanpierre, 1994).

Mediante el empleo de enzimas de restricción es posible detectar estas secuencias internas específicas repetitivas. Por ejemplo, las enzimas de restricción *EcoRI* y *HaeIII* no cortan el ADN satélite I. Sin embargo, el ADN satélite II es digerido con *EcoRI* dando lugar a un fragmento de 1,77 kb, y a una serie de fragmentos de ADN que se tiñen débilmente con bromuro de etidio en el rango de peso molecular mas bajo (0,34 kb; 0,68 kb) y más alto (2,2 kb; 3,4 kb).



Los fragmentos de ADN presentes en el intervalo de peso molecular más bajo son múltiplos íntegros de una unidad de repetición básica de 170 pb y por lo tanto evidencian una organización en tándem. Este patrón de fragmentos se pone de manifiesto cuando se altera el lugar de restricción de la unidad básica, mediante una mutación puntual o cuando estas mutaciones puntuales aparecen agrupadas u ocurren a intervalos regulares a lo largo de la secuencia a estudiar. Con la enzima de restricción HaeIII el ADN satélite II permanece sin cortarse, junto con una fracción de ADN débil, de una longitud de 340 pb. El ADN satélite III se corta frecuentemente con ambas enzimas. Pueden diferenciarse al menos tres subfamilias de ADN satélite III con HaeIII (Mitchell et al., 1979). La primera familia es resistente a la ruptura. La segunda familia forma una escalera de fragmentos de ADN con una unidad de repetición básica de 170 pb. La tercera familia está representada por un fragmento de ADN de 3,4 kb, que está presente sólo en el ADN de los hombres y se ha demostrado que reside específicamente en el cromosoma Y (Cooke, 1976; Bostock et al., 1978). Por lo tanto, la estructura de mayor orden de la secuencia repetitiva del Y relacionada con la subfamilia del satélite III, debe de ser específica de dicho cromosoma.

Posterior análisis de secuencia de los miembros clonados de la subfamilia HaeIII de 3,4 kb proporcionaron evidencias de que su hibridación cruzada restringida es el resultado de una organización específica del cromosoma Y de diferentes bloques de secuencias de satélite III repetitivos, secuencias específicas y no específicas del cromosoma Y, que están organizadas en tándem en subdominios. También se han descrito organizaciones de bloques de secuencias cromosoma-específicas en subfamilias del satélite III en el cromosoma 1 (Cooke y Hindley, 1979), en el cromosoma 7 (Beauchamp et al., 1979), en el cromosoma 9 (Moyzis et al., 1987), en el cromosoma 15 (Higgins et al., 1985) y en los cromosomas 16 y 22 (Jeanpierre et al., 1985). En el cromosoma 16 se ha aislado una subfamilia cromosoma-específica de ADN satélite II (Moyzis et al., 1987). Al menos dos subfamilias HinfI diferentes de ADN satélite I se concentran en el cromosoma Y (Fromer et al., 1984).

Los principios principales en la organización de las subfamilias de secuencias repetitivas entre las diferentes fracciones de ADN satélite se han

puesto de manifiesto mediante análisis de secuencias de miembros de ADN satélite clonados (Prosser et al., 1986). La principal característica del satélite I es la alternancia de dos bloques de secuencias ricas en A-T de 17 pb (A) y de 25 pb (B), cortadas por el enzima RsaI, ej. (ABABA)<sub>n</sub>. La estructura repetitiva de mayor orden está formada por la pérdida de lugares de restricción para RsaI. De este modo, la subfamilia de ADN satélite I de 2,47 kb específica del cromosoma Y se digiere con RsaI solamente en fragmentos de 2,2 kb y 0,29 kb. Sin embargo, la mayor parte del ADN satélite I se digiere con RsaI en fragmentos de menos de 150 pb. Los ADN satélites II y III están caracterizados por la repetición de 5 pb 5'ATTCC-3'. Sin embargo, las secuencias de ADN de la fracción del ADN satélite II, siempre contienen esta secuencia en forma altamente divergente. Esta diferencia en la organización de la secuencia se revela mejor con HinfI. Las secuencias de ADN satélite II se digieren con HinfI en un gran número de fragmentos pequeños (10-80 pb). El modelo de digestión con HinfI del ADN satélite III constituye una escalera completa desde 15 pb hasta más de 250 pb con multímeros adyacentes separados por un incremento de 5 pb, la unidad básica de repetición. El análisis de la secuencia ha mostrado que la escalera a la que da lugar HinfI en el ADN satélite III está compuesta por una secuencia repetitiva general (Prosser et al., 1986): [5'-(ATTCC)<sub>11</sub>-A T/C-TCGGGTG-3']<sub>m</sub>.

El clonaje y la secuenciación de muchas secuencias de ADN satélite que contienen super-repeticiones específicas demuestran que la principal vía de evolución para el desarrollo de estructuras repetitivas de mayor orden, en cromosomas específicos, es la amplificación continua de bloques de secuencias seleccionadas como específicas, ej., por la pérdida o ganancia de lugares de restricción organizados en tándem (Prosser et al., 1986).

La estructura del bloque locus-específico de las secuencias satélite I y III parece ser especialmente compleja en el brazo largo del cromosoma Y. Las subfamilias específicas del Y están compuestas principalmente de la subfamilia de satélite III HaeIII de 3,4 kb (Kunkel et al., 1979; Smith et al., 1987), ahora definidas como la secuencia DYZ1 (Miller et al., 1984) y la subfamilia satélite I MspI de 2,47 kb (Cooke et al., 1982), ahora definida como secuencia DYZ2

(Miller et al., 1984). Ambas familias de secuencias comprenden 18.000 kb de ADN en el brazo largo del cromosoma Y (ej. el 60% del ADN del cromosoma Y completo). La repetitividad de la familia de la secuencia DYZ1 se ha estimado en 4.000 copias. Se ha demostrado que la amplificación de bloques de secuencia de DYZ1 es la razón del polimorfismo de longitud del bloque completo de la heterocromatina en esta región cromosómica (McKay et al., 1978). El análisis molecular de estructura super-repetida de HaeIII de 3,4 kb ha revelado una disposición compleja de las secuencias de ADN repetitivas, específicas para el cromosoma Y (70%) asociadas con secuencias de ADN repetitivas no específicas para el cromosoma Y (30%; Kunkel et al., 1979). Las secuencias de ADN no específicas del Y forman subfamilias relacionadas por diferentes vías con la subfamilia de ADN satélite III del cromosoma 1, del cromosoma 15 y del cromosoma 16 (Burk et al., 1985). Una serie de pasos de amplificación de complejos subdominios ha producido la estructura de mayor orden de la repetitiva DYZ1 específica del cromosoma Y.

Lo mismo ocurre en las secuencias de ADN de la familia DYZ2 (Cooke et al., 1982). Solamente el cromosoma Y humano lleva esta familia de secuencias, con unas 2.000 copias de un bloque repetitivo de 2,47 kb, cortado por ejemplo por la enzima MspI. La especificidad del cromosoma Y está de nuevo basada en una secuencia específica, dispuesta de sub-elementos que pertenecen a la fracción de ADN satélite I, formando dos subdominios. Un subdominio consiste en un bloque de secuencia repetitivo de 2,47 kb, organizado en tándem y compuesto de tres fragmentos internos HinfI, 775 pb, 820 pb y 875 pb; el otro subdominio tiene una secuencia repetitiva principal de 1,7 kb sin ningún lugar interno HinfI, a pesar de que está compuesto de dos fragmentos HinfI, 820 pb y 875 pb del primer subdominio. Un bloque de secuencia repetitiva de 2,47 kb del satélite I de ADN sin sitios HinfI internos, está presente en otros cromosomas (Frommer et al., 1984). La mayoría de los ADN satélite I no se cortan con HinfI. La estructura del subdominio del cromosoma Y del ADN satélite I se debió desarrollar por pasos de amplificación independientes de los dos bloques diferentes de secuencia de ADN satélite I.



Además, para la caracterización de los distintos lugares internos de *HinfI*, el fragmento *HinfI* interno de 775 pb del primer dominio es específico por la integración de una copia de secuencia de la familia altamente repetitiva *Alu* (Fromer et al., 1984).

Existen otros tipos de ADN satélite que no se pueden separar por centrifugación en gradiente de densidad. Entre ellos se encuentra el ADN satélite alfa o **satélites alfoides** (Strachan et al., 1999; Tyler-Smith et al., 1993). Son secuencias de ADN repetitivo en el genoma humano con un monómero principal de 171 pb de longitud y una organización en tándem, se relacionan con la familia de la secuencia satélite alfa del mono verde africano, debido a una homología de secuencia de entre el 75% y 80% (Wu y Manuelidis, 1980). Inicialmente se identificaron mediante digestión del ADN genómico con la endonucleasa de restricción *EcoRI*, que da lugar a un fragmento de 340 pb (Manuelidis, 1978). Sin embargo, este fragmento cortado con *EcoRI* consiste en dos copias de la secuencia de ADN alfoide repetidas en tándem, de 169 pb y 171 pb, con una divergencia en la secuencia del 27%. El dímero de *EcoRI* parece ser la subunidad básica de las unidades más largas de secuencias de ADN alfoides repetitivas en tándem, ya que su variación en la secuencia no es más del 1% (Wu y Manuelidis, 1980). Ya que la divergencia entre el ADN satélite alfa del mono y la unidad del dímero *EcoRI* es del 35%, en ambos bloques de ADN alfoide, el sellado de la unidad de la secuencia alfoide en un bloque dimérico debe de haber ocurrido recientemente, probablemente durante la evolución de los grandes monos y homínidos (Maio et al., 1981). El clonado de varios miembros de las unidades de la secuencia *EcoRI* diméricas y tetraméricas ha revelado una divergencia en la secuencia del 13%-20% entre unidades diméricas diferentes y hasta el 45% entre subunidades monoméricas adyacentes (Shmookler-Reis et al., 1985). Las unidades de secuencia de ADN alfoide tetramérico caracterizadas por el lugar de restricción *XbaI* divergieron un 21% de la secuencia del tetrámero *EcoRI* (Gray et al., 1985). De este modo, los datos indican que en la familia de la secuencia de ADN alfoide humano debe haber una mezcla divergente de subfamilias de secuencias repetitivas, similar al ADN satélite, pero con una secuencia básica común de 171 pb. Las secuencias de las subfamilias se pueden diferenciar mediante experimentos con hibridación "in situ". La repetición

dimérica EcoRI hibrida predominantemente con los centrómeros de los cromosomas 1, 3, 5, 6, 7, 10, 19 (Manuelidis, 1978), mientras que el tetrámero de 682 pb XbaI hibrida principalmente con los centrómeros de los cromosomas 2, 4, 14, 15, 18, 20, 22 (Gray et al., 1985).

Aunque la divergencia en la secuencia en ambas subfamilias es a groso modo la misma (20%-30%), para poder explicar el patrón de hibridación cromosómico diferente de las secuencias en tándem, la organización de la secuencia en tándem de ambas subfamilias de alfoides debe de ser diferente. Sabemos que cada cromosoma contiene al menos una estructura super-repetida alfoide específica, a menudo definida por un lugar de restricción repetido en tándem cromosoma-específico (Willard, 1985). Los pasos de amplificación de la secuencia en tándem de estas super-repeticiones durante la evolución crearon los bloques de la estructura de la secuencia específica cromosómica. Miembros clonados de estos bloques de secuencia hibridan exclusivamente en dirección contraria a los bloques de secuencia parental. La comparación de varias unidades monoméricas con estructuras super-repetidas y entre diferentes estructuras super-repetidas en diferentes cromosomas indican varios pasos de amplificación subsecuente. Durante la evolución de la familia de la secuencia de ADN alfoide en varias regiones centroméricas la repetición dimérica EcoRI parece ser específica para la estructura de ADN alfoide en los cromosomas 7 y 18 (Jorgensen et al., 1986; Devilee et al., 1986) y debe de ser una estructura evolutivamente muy conservada porque se puede encontrar también en la estructura de la secuencia de ADN alfoide de los grandes monos (Maio et al., 1981). Otra repetición conservada, pero con una unidad de pentámero, se encontró en los cromosomas 1, 11, 17, y X (Willard y Waye, 1987). Los cinco monómeros distintos designados como A, B, C, D, E se organizan en esta unidad de pentámero como una super-repetición EABCD. Además, organizaciones de secuencia cromosoma-específica, tales como inversiones, deleciones, y transposiciones, seguidas de pasos de amplificación subsecuentes, han creado la estructura de mayor orden. Los mecanismos potenciales de mutaciones que dirigen la compleja composición de la estructura de mayor orden repetitiva en tándem de los alfoides en cada cromosoma, parecen por lo tanto ser los mismos que en los demás ADN satélites.

El proceso de multiplicación de un bloque de secuencia dada no empieza en posiciones de las secuencias al azar. Esto se descubrió tras la descripción del subdominio HindIII en el cromosoma X (Durfy y Willard, 1987). Una mutación en una base crea un nuevo lugar de restricción para HindIII, en la unidad de repetición BamHI de 2 kb predominante del cromosoma X (5000 copias de la secuencia). En este punto específico parece que se inicia la amplificación de la unidad de repetición HindIII variante. Esto crea un dominio polimórfico que consiste en aproximadamente 500 copias de la unidad de repetición variante, incluida en el bloque principal de secuencia repetitiva BamHI.

El análisis molecular de repeticiones de ADN alfoide clonado hibridando "in situ" con todos los cromosomas, tales como la secuencia p308 (Jabs et al., 1989) y la secuencia p82H (Mitchell et al., 1985), indican que las superestructuras de ADN alfoide de cada cromosoma contienen un gradiente de especificidad que va aumentando hacia la región telomérica.

Para resumir los datos concernientes a la evolución de las estructuras de ADN alfoides específicas de cromosomas en los cromosomas humanos, podemos señalar que las alteraciones de las secuencias, incluyendo pasos de amplificación sucesivos, inserción de secuencias de ADN no alfoides (por ejemplo: repeticiones Alu; Jorgensen et al., 1986), mutaciones puntuales y, en particular, deleciones y transposiciones son la principal fuente de especificidad conectada con cada estructura de mayor orden de las secuencias ADN alfoides.

Tras el aislamiento de la subfamilia Sau3A de ADN alfoide extracromosómico se han evidenciado los procesos de delección o transposición como un mecanismo básico en la alteración de la secuencia (Kiyama et al., 1986). La subfamilia Sau3A consiste en una unidad de secuencia base de 850 pb conteniendo cinco subunidades de 170 pb. En células HeLa cultivadas, se encuentran extracromosómicamente círculos de unidades oligoméricas y monoméricas cerradas covalentemente. La unidad de secuencia parece ser inestable en los cromosomas, causando un elevado grado de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) entre individuos. Los productos de recombinación recíproca entre subunidades, incluso con sólo el 70%-80% de



homología en la secuencia, sugieren que eventos tales como la recombinación, están asociados con este tipo de secuencia de ADN (Okumura et al., 1987). Esta hipótesis se ve reforzada por el aislamiento de otras subfamilias de ADN alfoides extracromosómicas (Jones y Potter, 1985). Sin embargo, es interesante señalar que el satélite alfa parental relacionado del mono verde africano no presenta la misma complejidad ni divergencia. La explicación de esta diferencia entre los cromosomas humanos y el del mono verde africano, podría ser que las regiones centroméricas de los cromosomas humanos hayan sido favorecidas mediante mecanismos de reasociación rápidos como la amplificación y la transposición de secuencias de ADN repetitivas durante la evolución.

### 3.1.2. **ADN minisatélite.** Se diferencian dos familias:

**Familia telomérica**, cuya unidad de repetición es de 6 pb y se encuentra en los telómeros de todos los cromosomas

**Familia hipervariable**, cuya unidad de repetición es de 9-24 pb. Se encuentra en todos los cromosomas, a menudo cerca de los telómeros.

### 3.1.3. **ADN microsatélite.** Se encuentran a lo largo de todos los cromosomas y la unidad de repetición tiene un tamaño de 1-4 pb.

## 3.2. **ADN disperso.**

En este caso las unidades de repetición no están agrupadas formando bloques sino que están intercaladas con el resto del ADN. Dependiendo de la longitud de las unidades de repetición podemos diferenciar 2 grupos:

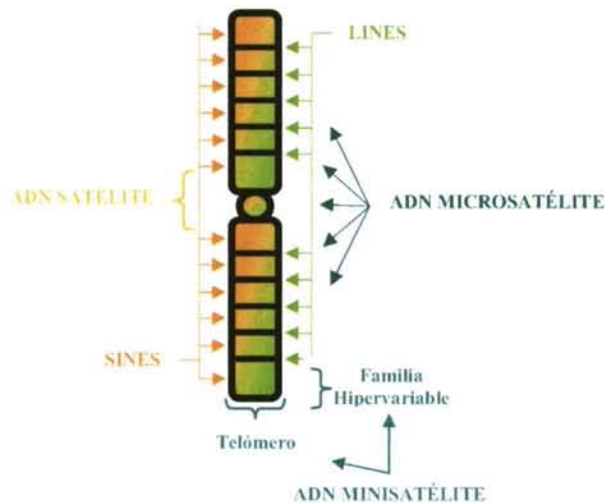
### 3.2.1. **SINES.**

Elementos cortos que están intercalados entre el ADN de copia única. Dentro de este grupo encontramos la familia Alu, formada por repeticiones de aproximadamente 280 pb, aunque existe una gran variabilidad en esta longitud. Tienen un contenido relativamente elevado en G y C. Se encuentra dispersa en

las regiones eucromáticas del cromosoma, localizándose preferentemente en las bandas R.

### 3.2.2. LINES.

Elementos largos que se intercalan entre el ADN de copia única. Dentro de este grupo se encuentra la familia LINE 1 o L1 que se encuentra localizada de modo disperso por los cromosomas, pero a diferencia de las secuencias Alu, se localizan preferentemente en las bandas G (Therman et al., 1992).



**Figura 1.** Esquema de la distribución de las secuencias de ADN altamente repetidas.

En los cromosomas de ratones (género *Mus musculus*), que son generalmente acrocéntricos, con el centrómero situado muy cerca del extremo del cromosoma (Evans, 1981; Kipling et al., 1991), también existen ADN satélites:

- **El ADN satélite menor.** ADN repetitivo asociado con el centrómero, como se ha podido comprobar mediante hibridación “in situ” por la presencia de antígenos centroméricos (Pietras et al., 1983; Wong y Rattner, 1988; Joseph et al., 1989;

Broccoli et al., 1990; Moens y Pearlman, 1990; Wong et al., 1990). Este satélite está formado por repeticiones en tándem de un monómero de 120 pb (Pietras et al., 1983; Wong y Rattner, 1988) y tiene pequeñas secuencias similares a los satélites  $\alpha$  presentes en los centrómeros humanos.

- **El ADN satélite principal.** En *Mus musculus*, se encuentra localizado en la heterocromatina constitutiva pericentromérica del brazo largo. Está compuesto por unidades repetitivas de 234 pb, generadas por la duplicación de una secuencia repetitiva de 117 pb. Dentro de esta secuencia se pueden distinguir dos subunidades más, cada una de las cuales está formada por un cuarto de repetición con mitad  $\alpha$  y  $\beta$ , derivadas de una secuencia de 9 pb (Lewin, 1997).

### Estructura del cromosoma

Los cromosomas en metafase están condensados, presentando estructuras diferenciadas visibles al microscopio. Cada cromosoma metafásico está formado por dos porciones idénticas llamadas **cromátidas hermanas**. Además, los cromosomas poseen una constricción principal denominada **centrómero**. Cada cromosoma posee el centrómero en una posición fija característica. Existen funciones cromosómicas muy específicas asociadas a los centrómeros y además constituyen el último punto de contacto entre las cromátidas hermanas antes de su separación final durante la división mitótica. Las regiones centroméricas, a diferencia de los brazos de los cromosomas, se tiñen generalmente de forma densa y compacta. A estas regiones cromosómicas capaces de teñirse intensamente, se les denomina **heterocromatina**, y a las regiones cromosómicas que no son heterocromáticas se las denomina generalmente **eucromatina**.

En la eucromatina nos encontramos la mayor parte de los genes estructurales, siendo la mayoría copias únicas de secuencias de ADN. Este ADN se condensa durante la mitosis y se descondensa durante la interfase, seguramente para permitir la transcripción de los genes. Sin embargo, la heterocromatina se encuentra principalmente en las zonas cercanas a los centrómeros, posee un número menor de genes que la eucromatina y está constituida mayoritariamente por secuencias de ADN repetitivas.

Esta naturaleza repetitiva de la heterocromatina puede ser esencial para la estructura y función de los cromosomas (Wallrath, 1998). En estas regiones los segmentos de la cromatina están altamente condensados y se replican de forma tardía en la fase S del ciclo celular (Passarge, 1979).

Se pueden distinguir dos clases de heterocromatina:

**Heterocromatina facultativa:** ADN eucromático que se inactiva de forma específica en algunas etapas del desarrollo. Un claro ejemplo es el caso del cromosoma X inactivo en las hembras de mamíferos. En las mujeres, un cromosoma X de cada célula se inactiva durante la fase de blastocisto, comportándose como heterocromatina. Se condensa durante la interfase, no presenta transcripción, y se replica tardíamente durante la fase S del ciclo celular.

**Heterocromatina constitutiva:** está formada por ADN repetitivo de secuencia simple. Se localiza a menudo en el centrómero, en las bandas C y en el extremo distal del cromosoma Y (Therman et al., 1992).

Los extremos de las cromátidas, o **telómeros** también son heterocromáticos y son las estructuras ADN-proteínas en los finales de los cromosomas de organismos eucariotas. Los telómeros en los vertebrados consisten en repeticiones de la secuencia TTAGGG, asociados con proteínas específicas (Moyzis et al., 1988). La función de los telómeros es prevenir fusiones cromosómicas entre los extremos de los cromosomas y prevenir su degradación exonucleolítica (Meyne et al., 1990). Las secuencias teloméricas se mantienen gracias a la acción de la **telomerasa**, que es una reverso transcriptasa específica del telómero, aunque para el mantenimiento del telómero también existen mecanismos independientes de la telomerasa. En ausencia de telomerasa o de mecanismos alternativos las secuencias teloméricas se van perdiendo progresivamente tras cada ronda de replicación del ADN.

Debido a que la pérdida de telómeros provoca cambios cromosómicos asociados con el cáncer y con el envejecimiento, el entendimiento de la biología del telómero tiene gran relevancia (Zakian, 1995).



En una gran variedad de vertebrados se han identificado repeticiones (TTAGGG) $_n$  en regiones intracromosómicas (ITRS) (Meyne et al., 1990; Azzalin et al., 1997). Mientras que el ADN telomérico, interactuando con varias proteínas, juega un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y en la prevención de fusiones cromosómicas (Collins, 2000), no se ha encontrado una función específica a las secuencias teloméricas intersticiales (ITs).

En el genoma humano podemos encontrar tres tipos de secuencias teloméricas intersticiales (Azzalin et al., 2001):

1. **ITs cortas.** Son repeticiones en tándem de la unidad esencial TTAGGG.
2. **ITs subteloméricas.** Son más largas e incluyen varias unidades degeneradas en los dominios subteloméricos.
3. **ITs fusión.** Son pares de secuencias extendidas orientadas cabeza con cabeza.

Inicialmente se propuso que las ITs eran reliquias de fusiones de extremos de cromosomas ancestrales, que ocurrieron durante la evolución (Hastie y Allshire, 1989). Sin embargo, estudios mas recientes en ITs humanas indican que las que derivaron de fusiones teloméricas son extremadamente raras y que la gran mayoría de ITs podrían haberse generado a través de ADN telomérico durante la reparación de roturas de cadena doble (Azzalin et al., 2001).

En varias especies no humanas, está presente una cuarta clase de ITs, que está formada por bloques extendidos de ADN telomérico, en la región pericentromérica de la mayoría de los cromosomas (Meyne et al., 1990). En el caso del hámster chino, (*Cricetulus griseus*), se han encontrado bloques de secuencias teloméricas en regiones centroméricas-pericentroméricas en la mayoría de sus cromosomas, comprendiendo cientos de kilobases de ADN en cada cromosoma (Faravelli et al., 1998). En comparación con las células de hámster chino primarias, las líneas celulares, presentan secuencias teloméricas terminales mucho más cortas, las cuales son indetectables mediante FISH convencional (Slijepcevic y Bryant, 1995). Los posibles orígenes de

estas ITRS incluyen fenómenos de fusión telómero-telómero durante la evolución (Hastie y Allshire, 1989; Meyne et al., 1990; Slijepcevic y Bryant, 1995; Faravelli et al., 1998), o la inserción de ADN telomérico en lugares inestables, durante la reparación de roturas de cadena doble (Azzalin et al., 2001). La FISH en fibras de ADN extendido y en cromosomas mecánicamente elongados demostró que estas largas repeticiones de ADN telomérico son continuas e ininterrumpidas (Faravelli et al., 2002).

Las largas ITRS procedentes de líneas celulares de hámster chino se han encontrado como lugares preferenciales en la rotura cromosómica y en la recombinación, tanto espontánea como inducida. De esta manera, los lugares de delección cromosómica que acontecen durante la evolución cariotípica en las líneas celulares inmortalizadas de hámster chino, tienden a agruparse en ITRS (Balajee et al., 1996). De hecho, se pueden encontrar a menudo cromosomas marcadores que poseen ITRS procedente de origen centromérico-pericentromérico, en localizaciones intersticiales o terminales (Álvarez et al., 1993; Bertoni et al., 1994; Balajee y Natarajan, 1994; Fernández et al., 1995). Además, los bloques de ITRS de las líneas celulares de hámster chino se comportan como “hot-spots” (puntos calientes) para la rotura cromosómica y recombinación inducida por irradiación (Pandita y DeRubeis, 1995; Slijepcevic et al., 1996; Bertoni et al., 1996). La rotura en los bloques largos de ITRS puede también producir inestabilidad cromosómica tardía y amplificación de secuencias de ADN (Álvarez et al., 1993; Slijepcevic et al., 1997). Junto a las largas ITRS centroméricas-pericentroméricas, los cromosomas de hámster chino también contienen repeticiones teloméricas mucho más cortas en posiciones intracromosómicas no centroméricas (Bertoni et al., 1994). Sin embargo, no todas las ITRS son “hot-spots” para roturas y reordenamientos (Simi et al., 1998), y la sensibilidad a la rotura de las ITRS cortas no está clara (Bouffler, 1998; Desmaze et al., 1999). Prácticamente todos los estudios acerca de la sensibilidad a la rotura y recombinación se han realizado a nivel cromosómico, esto es, visualizando el resultado final tras un proceso complejo de inducción, señalización, procesamiento y reparación del ADN dañado.



## EFFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN EL ADN

Las radiaciones ionizantes son capaces de inducir en el ADN una gran variedad de lesiones. La radiación ionizante puede dañar el ADN directamente o indirectamente por la generación de radicales hidroxilo, resultantes de la radiolisis del agua (O'Neill y Fielden, 1993). Esto puede provocar la aparición de roturas de cadena, el daño oxidativo en residuos de azúcares o bases, la rotura de cadena doble, etc. (Wallace, 1988).

A continuación se citan las lesiones más relevantes que producen las radiaciones en el ADN:

- La pérdida o la modificación de bases.
- La **rotura de cadena sencilla** (ssb del inglés single strand break).
- La **rotura de cadena doble** (dsb del inglés double strand break).
- Los entrecruzamientos ADN-proteínas.
- La lesión en la desoxirribosa.
- Lesión en el grupo fosfato.
- El entrecruzamiento intracatenario.
- El entrecruzamiento intercatenario.
- Las **lesiones múltiples co-localizadas** (o "cluster" del inglés).

En la tabla 1 se puede observar una estima del número de algunas de las lesiones físicas y bioquímicas que ocurren en células de mamíferos cuando se irradian con 1 Gy de irradiación de baja LET (*Transferencia Lineal de Energía* es la tasa según la cual se deposita la energía a medida que una partícula cargada se mueve a través de la materia. Se expresa en kiloelectrón voltio por micra (keV/μ), y depende de las propiedades físicas de la irradiación, es decir, de su masa y de su carga) (Goodhead, 1994).

### *Lesiones físicas iniciales*

### *Número de lesiones*

Ionizaciones en el núcleo celular	100.000
Ionizaciones directamente en el ADN	2.000
Excitaciones directamente en el ADN	2.000

*Lesiones bioquímicas específicas*

Roturas de ADN de cadena sencilla	1.000
8-hidroxiadeninas	700
lesiones en la timina	250
roturas de ADN de cadena doble	40
uniones cruzadas ADN-proteína	150

*Efectos celulares específicos*

Sucesos letales	0.2-0.8
Aberraciones cromosómicas	1
Mutaciones en HPRT	$10^{-5}$

**Tabla 1.** Algunos de los daños originados en un núcleo de célula de mamífero tras exposición a un 1Gy de irradiación de baja LET.

En las **roturas de cadena sencilla** son importantes la estructura química de ambos extremos, debido a las posibles secuelas biológicas y a la activación posterior de mecanismos de reparación. Por esto Obe et al., en 1992 establecieron cuatro clases de roturas de cadena sencilla:

-**Clase I:** rotura del enlace fosfodiéster. No modificación de azúcares o bases.

-**Clase II:** rotura del enlace fosfodiéster. Azúcares y bases normales. Pérdida del grupo fosfato terminal.

-**Clase III:** rotura del enlace fosfodiéster. Azúcares o bases dañadas en el extremo.

-**Clase IV:** rotura del enlace fosfodiéster. Pérdida de un nucleótido.

Las **roturas de cadena doble** son muy importantes en relación con la integridad genómica, porque pueden dar lugar a aberraciones cromosómicas, que pueden afectar,

simultáneamente, a muchos genes y llevar al mal funcionamiento celular o incluso a la muerte celular (van Gent et al., 2001).

El **daño múltiple co-localizado** aparece cuando dos o más lesiones de la misma naturaleza o distinta (modificación de bases, lugares abásicos, roturas de cadena sencilla), se producen próximas unas a otras, generalmente en el espacio de una vuelta de hélice del ADN (Dianov et al., 2001).

Las células han desarrollado sistemas de reparación para tratar las lesiones de ADN aisladas y de este modo mantener la integridad del genoma (Friedberg et al., 1995). Ya que la eficacia biológica de la radiación ionizante aumenta con el incremento de la LET, el daño en el ADN múltiple co-localizado puede ser un determinante crítico en la capacidad de la célula para reparar el daño (Ward, 1988; Goodhead et al., 1993; Friedberg et al., 1995). Las roturas de cadena doble inducidas por irradiación son un tipo de lesiones co-localizadas fácilmente detectables. Además, el reconocimiento y procesamiento de las roturas de cadena doble no siempre se lleva a cabo con gran fidelidad (Rothmann y Löbrich, 1999), por lo tanto este tipo de daño en el ADN co-localizado puede dar lugar a la muerte reproductiva de la célula o a aberraciones cromosómicas. Si el daño es transmitido a las células hijas, podría dar lugar a mutaciones y a cánceres inducidos por la irradiación. Sin embargo, también se piensa que otros tipos de lesiones co-localizadas en el ADN, como la lesión en dos o más bases, y una rotura de cadena sencilla producida en unas pocas pares de bases, pueden ser inducidas por las radiaciones ionizantes. De hecho, hay estudios (Chaudhry y Weinfeld, 1995; Harrison et al., 1999; David-Cordonnier et al., 2000) que indican que el daño en el ADN múltiple co-localizado que contiene una lesión en una base, puede comprometer la excisión de estas bases dañadas por las enzimas, que son generalmente eficientes cuando la lesión de la base está aislada. De esta manera, es importante tener en cuenta la contribución que estas bases dañadas pueden hacer a la efectividad biológica de la irradiación en lesiones múltiples del ADN.

Experimentalmente es difícil detectar daño múltiple en el ADN a nivel celular (Prise et al., 1998) y en los sistemas modelo (Krisch et al., 1991), con excepción de las roturas de cadena doble. Existen evidencias indirectas que apoyándose en las predicciones de simulaciones biofísicas, proponen que el efecto biológico de la

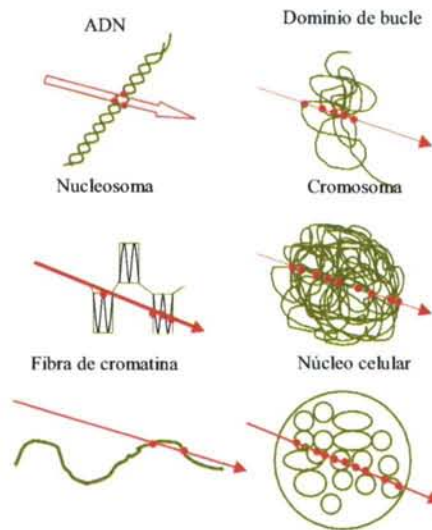
irradiación está relacionado con la complejidad del daño múltiple en el ADN, obteniéndose una disminución en la reparación de roturas de cadena doble radioinducidas en las células y un aumento de dsbs por ssb al aumentar la LET de la irradiación (Blocher, 1988; Prise et al., 1998). Sin embargo, se reconoce (Ward, 1985) que el daño múltiple en el ADN, que no contiene dsb y por lo tanto no es detectable fácilmente mediante electroforesis en gel, podría contener lesiones en bases asociadas con otras lesiones en bases o con una ssb.

La detección del daño múltiple co-localizado, al contrario que las lesiones aisladas, mediante técnicas químicas analíticas están todavía en su infancia, pero se han detectado en sistemas modelo lesiones en tándem radioinducidas, donde tanto lesiones en bases adyacentes o bases adyacentes unidas covalentemente se forman en la misma cadena de ADN tras la irradiación (Paul et al., 1988). Sin embargo, recientemente se han descubierto nuevos modelos de detección de daño múltiple, sin ser dsb, inducidos en plásmidos de ADN, en los cuales se usan proteínas de reparación por excisión de bases (Prise et al., 1999; Milligan et al., 2000). En estos estudios, el ADN plasmídico se irradiaba en solución que contenía elevadas concentraciones de “atrapadores” de OH<sup>•</sup>, para limitar la distancia de difusión media de los OH<sup>•</sup>. Estas lesiones de bases, modificadas tras el tratamiento enzimático, se presentaban como gaps/ssbs, detectables realmente mediante electroforesis en gel. De este modo, si una lesión en una base está en unas 10 pb (Hanai et al., 1998) de una ssb en la cadena complementaria bajo estas condiciones iónicas, el daño en el ADN que no contiene dsb se revelará como dsb tras el tratamiento enzimático. Las dos proteínas que se han empleado para revelar daño múltiple en el ADN mediante eliminación de lesiones en bases/lugares abásicos son proteínas de *E.coli*, la endonucleasa III (Nth) y la glicosilasa ADN formamidopirimidina (Fpg), que reconocen varios tipos de lesiones de bases radioinducidas (Friedberg et al., 1995).

Si la irradiación es de baja LET, los “clusters” aparecen principalmente a pequeña escala, muy dispersos a lo largo de la molécula de ADN y en los nucleosomas. Por ejemplo, hay evidencias experimentales que sugieren que en la superficie del nucleosoma las dos cadenas del ADN pueden sufrir lesiones aisladas y que estas lesiones sólo ocurren en un módulo de 10 pb debido al efecto protector de las histonas. En las irradiaciones de alta LET, los “clusters” son de mayor magnitud y dependen de la



organización de la cromatina (Fig. 2). Cuando una partícula ionizante atraviesa la fibra de cromatina de 30nm se genera un “cluster” con regiones de ADN altamente dañadas, con un tamaño medio de 2 kpb. A mayor escala, la irradiación de alta LET, puede dar lugar a la aparición de roturas de cadena doble más próximas unas de otras de lo que se esperaría por azar. Este hecho provoca que aumente la probabilidad de fallos en la unión de los extremos de los cromosomas y la generación de aberraciones cromosómicas letales (Rydberg, 2001).



**Figura 2.** Diferentes niveles de la organización de la cromatina expuestos a una partícula cargada (flecha) que penetra desde la izquierda produciendo daño en el ADN (puntos negros) a su paso. El agrupamiento de roturas de cadena doble y otras lesiones se espera que se produzcan en los distintos niveles de la organización cromatínica.



## **MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN**

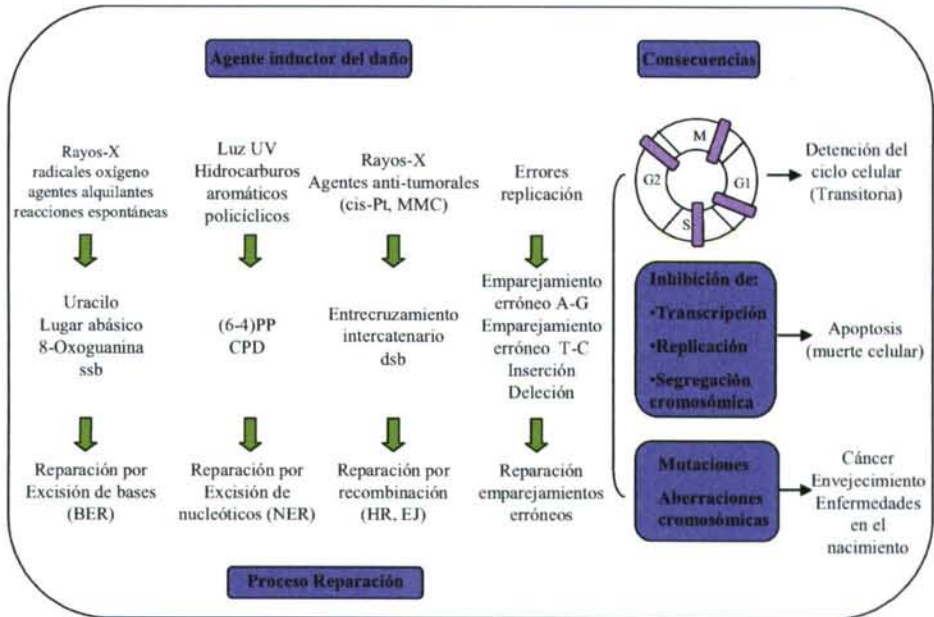
Ningún sistema de reparación único puede abordar todos los tipos de lesiones. En cambio, la evolución ha modulado un mosaico de sofisticados sistemas de reparación del ADN que de manera global cubren la mayoría de las lesiones producidas en la información genética de la célula viva. Defectos heredados en una de estas vías en general predispone a la malignidad. Ya que el problema del daño en el ADN ha existido desde el inicio, los sistemas de reparación del ADN deben de aparecer de manera temprana en la evolución. Esto explica por qué todas las vías de reparación conocidas están altamente conservadas. En mamíferos operan al menos cuatro vías principales de reparación del ADN, parcialmente solapadas (Friedberg et al., 1995; Lindahl y Wood, 1999):

- **reparación por excisión de nucleótidos (NER).**
- **reparación por excisión de bases (BER).**
- **reparación por recombinación homóloga (HR).**
- **unión de extremos no homólogos (NHEJ o EJ).**

La NER trata con una amplia clase de lesiones que afectan a la hélice del ADN, que interfieren con el emparejamiento de bases y generalmente obstruyen la transcripción y la replicación normal. Las alteraciones químicas pequeñas de bases se reparan mediante BER. Estas lesiones pueden impedir la transcripción y replicación. BER es particularmente relevante para prevenir la mutagénesis. La mayoría de las lesiones reparables mediante NER afloran por fuentes exógenas (excepto algunas lesiones oxidativas), mientras que BER repara mayoritariamente, pero no exclusivamente, lesiones de origen endógeno. Las lesiones para estos dos tipos de reparación afectan solamente a una cadena de ADN. En una reacción de “corte y empalme”, el daño (con o sin secuencias flanqueantes) se elimina y el hueco de cadena sencilla resultante se rellena con la cadena complementaria como modelo.

Las roturas de cadena doble son más problemáticas. Para tratar adecuadamente estas roturas la célula tiene que saber qué extremos van juntos, algo difícil dada la talla del genoma de mamíferos. Para solventar el problema de las roturas de cadena doble se

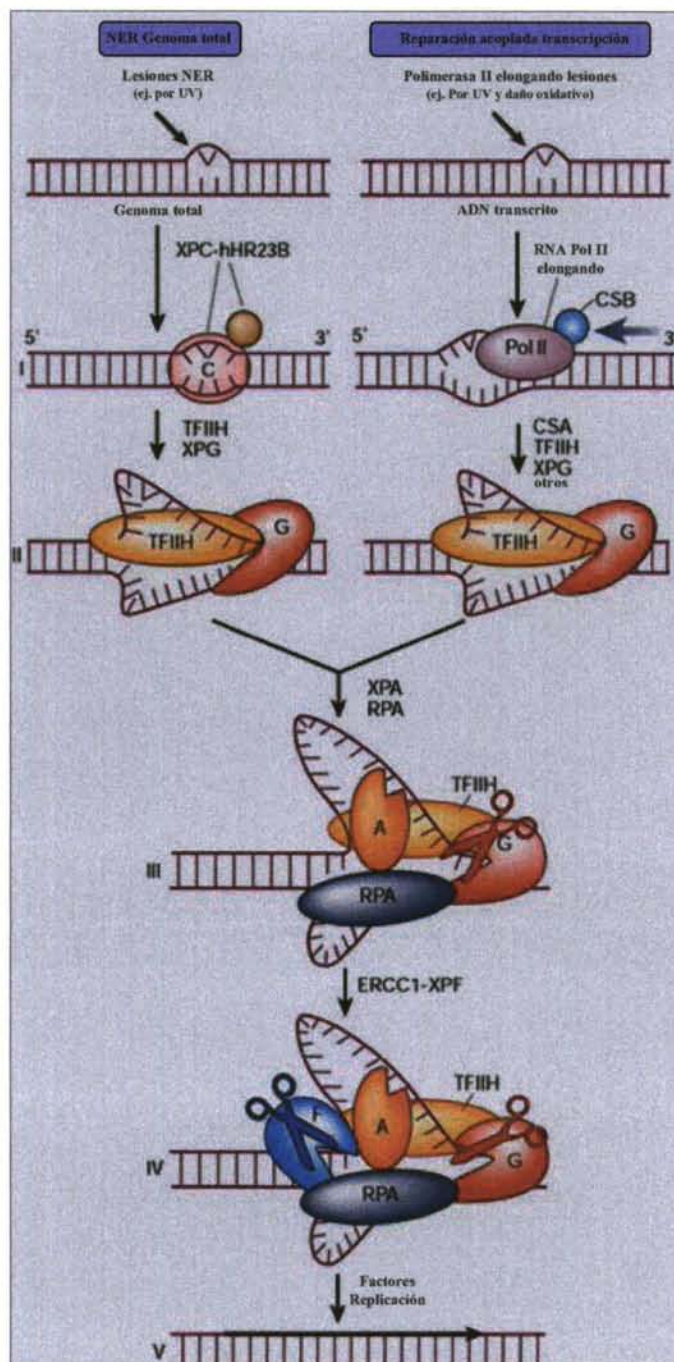
han desarrollado dos vías de reparación, la recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos. La recombinación homóloga parece dominar en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando el ADN se replica, y hay una cromátida hermana intacta. En contraste, la vía menos precisa de unión de extremos es mas relevante en la fase G1 del ciclo celular, cuando no se dispone de una segunda copia (Takata et al., 1998) (Fig. 3).



**Figura 3.** Daño en el ADN, mecanismos de reparación y consecuencias. Abreviaturas: cis-Pt y MMC, cis platina y mitomicina C, respectivamente (agentes de entrecruzamiento del ADN); (6-4)PP y CPD, 6-4 fotoproducto y dímero de pirimidina ciclobutano, respectivamente (ambos inducidos por luz ultravioleta); HR, recombinación homóloga; EJ, unión de extremos.

### Reparación por excisión de nucleótidos (NER)

De todos los sistemas de reparación, NER es el más versátil en términos de reconocimiento de lesiones. Existen dos subvías de NER con especificidad de sustratos parcialmente diferentes: NER genoma global (NER-GG) reconoce el genoma completo, y la reparación acoplada a la transcripción (TCR) se centra en el daño de los bloques elongados por las ARN polimerasas (Tornaletti y Hanawalt, 1999) (Fig. 4):



**Figura 4.** Esquema del mecanismo de reparación mediante la reparación por excisión de nucleótidos y la reparación de pares transcritos (Hoeijmakers, 2001)

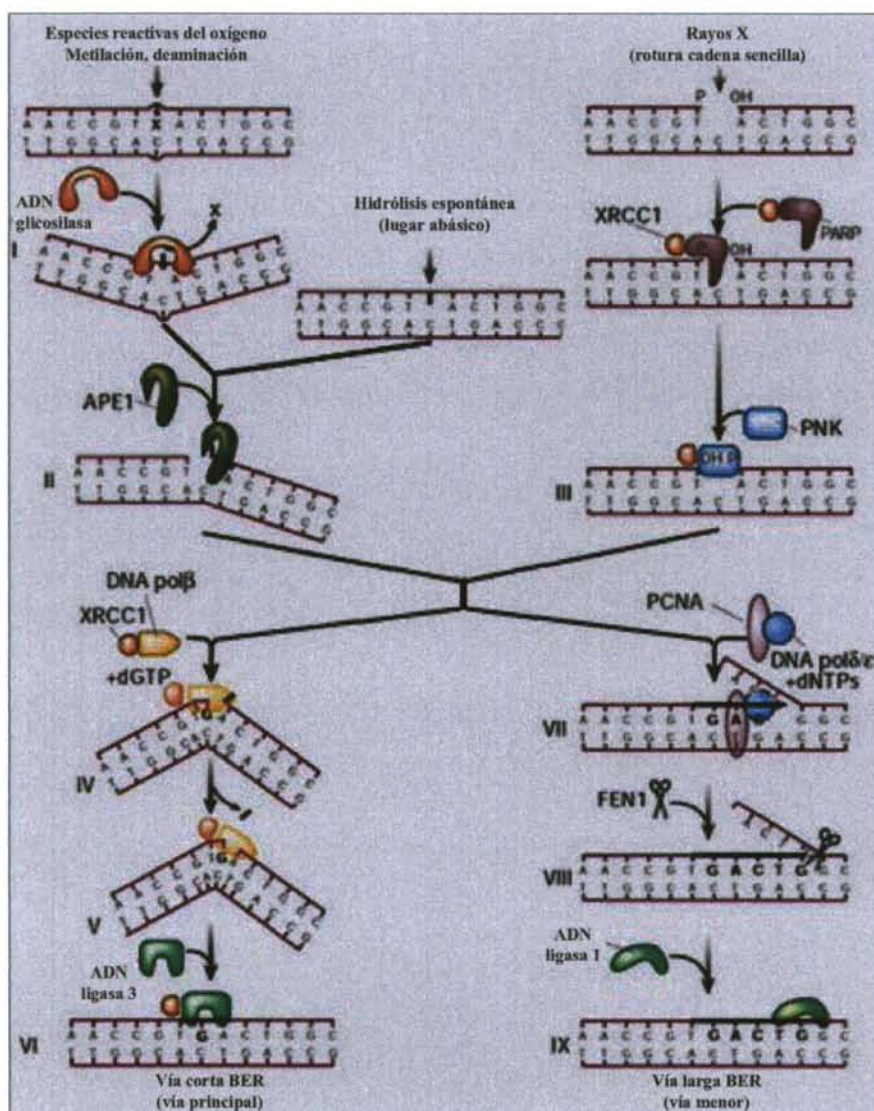


El complejo específico de NER-GG XPC-hHR23B selecciona primero, en base a las pares de base desparejadas (Sugasawa et al., 2001), en lugar de la lesión en sí. Esto explica porqué las lesiones que se descomponen medianamente, como los dímeros de pirimidina ciclobutano, se reparan pobremente (Tang et al., 2000). En TCR, la habilidad de una lesión (tanto por NER como por BER) para bloquear la ARN polimerasa parece crítica (fase I en la figura opuesta). El lugar donde se encuentra la polimerasa debe de ser reemplazada para hacer accesible la lesión a la reparación (Le Page et al., 2000), y esto requiere al menos a los factores específicos de TCR, CSB y CSA. Los estados subsecuentes de NER-GG y TCR deben de ser idénticos. Las helicasas XPB y XPD del factor de transcripción con multisubunidades TFIIH abre 30 pb de ADN alrededor de la lesión (paso II). XPA probablemente confirma la presencia del daño detectando estructuras enlazadas anormales (Buschta-Hedayat et al., 1999) y cuando falta se interrumpe el mecanismo NER (Sugasawa et al., 2001). La proteína RPA (proteína de replicación A) de unión a cadena sencilla estabiliza la estructura intermedia abierta mediante la unión a la cadena no dañada (paso III). El empleo de factores subsecuentes, cada uno con limitaciones en la capacidad para detectar las lesiones “in toto”, aún permite una especificidad en la lesión muy alta (Sugasawa et al., 1998). La endonucleasa dúo del grupo de NER, XPG y ERCC1/XPF, rompe los extremos 3' y 5' respectivamente de los bordes de la estructura abierta solamente en la cadena dañada, generando de 24-32 bases oligonucleotídicas que contienen la lesión (paso IV). La maquinaria de replicación del ADN completa la reparación mediante el relleno del hueco (paso V). En total, 25 o más proteínas participan en NER. Estudios “in vivo” indican que la maquinaria NER se ensambla en pasos desde componentes individuales en el lugar de la lesión. Después de un evento de reparación sencilla (que lleva varios minutos) el complejo entero se desensambla de nuevo (Houtsmuller et al., 1999).

### **Mecanismo por excisión de bases (BER).**

BER es el principal guardián frente al daño debido al metabolismo celular, incluyendo los productos resultantes de especies reactivas de oxígeno, metilación, desaminación e hidroxilación. El mecanismo molecular (Lindahl y Wood, 1999) se ha resuelto mediante el estudio de la estructura terciaria de todos los componentes (Wyatt

et al., 1999; Mol et al., 1999; Bruner et al., 2000) y se explica en el esquema siguiente (Fig. 5):



**Figura 5.** Esquema del mecanismo de reparación por excisión de bases (Hoeijmakers, 2001)

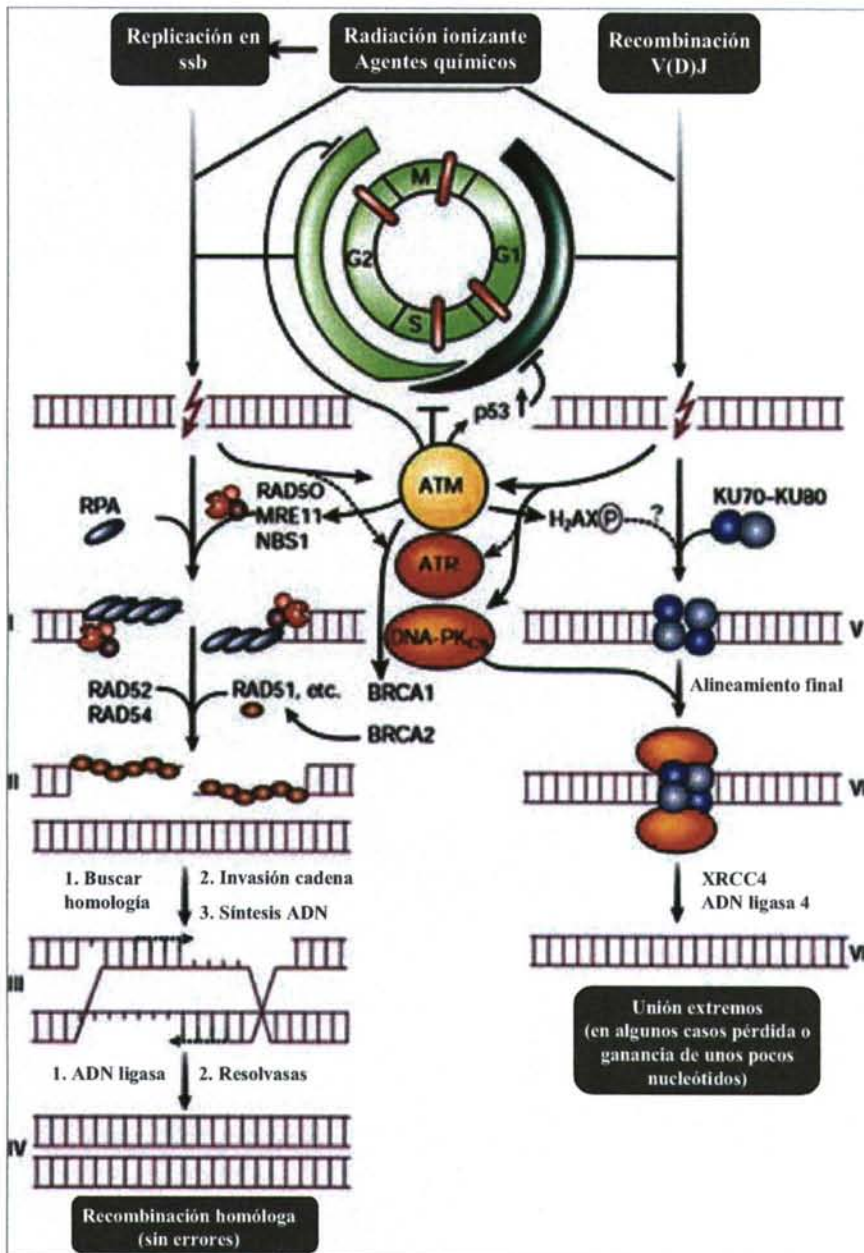


Una batería de glicosilasas, cada una tratando con un espectro de lesiones relativamente estrecho y parcialmente solapado, participan en la reacción núcleo. Las glicosilasas eliminan la base dañada de la hélice mediante compresión del esqueleto de ADN, acomodándole en una cavidad interna de la proteína. Dentro de la proteína, la base dañada es cortada por el enlace azúcar-fosfato (paso I). El lugar abásico resultante también puede aparecer espontáneamente por hidrólisis. La reacción núcleo BER se inicia mediante la incisión en el lugar abásico por la endonucleasa APE1 (paso II). La polimerasa poli ADP-ribosa (PARP), que se une y se activa mediante las roturas de cadena sencilla, y la recientemente identificada kinasa polinucleotídica (PKN) (Whitehouse et al., 2001) puede ser importante cuando BER se inicia desde una rotura de cadena sencilla para proteger y arreglar los extremos para la síntesis de reparación (III). En mamíferos, la llamada reparación de vía corta es el modo dominante para la reacción restante. La ADN pol  $\beta$  realiza rellena el hueco del nucleótido (paso IV) y elimina el residuo de azúcar sin base 5'terminal, vía su actividad liasa (V); esto es entonces seguido por el sellado por el complejo ligasa3-XRCC1 (VI). La proteína XRCC1 interactúa con la mayoría de los componentes del núcleo BER, y puede así ser instrumento en intercambio de proteínas. La vía larga de reparación implica a la ADN pol  $\beta$  pol  $\delta/\epsilon$ , el antígeno nuclear celular de proliferación (PCNA) para la síntesis de reparación (2-10 bases), así como la endonucleasa FEN1 que elimina el ADN desplazado y la ADN ligasa 1 para el sellado (pasos VII-IX). La reacción BER opera a través de todo el genoma. Sin embargo, algunas lesiones bloquean la transcripción y en este caso el problema se trata vía TCR, descrita anteriormente, incluyendo TFIIF y XPG (que también estimula algunas de las glicosilasas) y probablemente al resto de la reacción núcleo NER.

### **Reparación de roturas de cadena doble: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ o EJ)**

Las roturas de cadena doble aparecen por acción de las radiaciones ionizantes, radicales libres, agentes químicos y durante la replicación de una rotura de cadena sencilla. Después de la detección de roturas de cadena doble, una compleja cascada de reacciones afecta a la maquinaria del ciclo celular y recluta los factores de reparación (Zhou y Elledge, 2000; Khanna y Jackson, 2001). Uno de los iniciadores tempranos es la proteína kinasa de la ataxia telangietasia (ATM), que es defectuosa en el síndrome de

ataxia telangietasia dando lugar a una hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes y a una predisposición al cáncer (Rotman y Silo, 1998). La detección del daño en la fase G1 del ciclo celular es mediada por p53. Otro evento temprano, que depende de las proteínas kinasas ATM, ATR (relacionada con la ataxia telangietasia) y la DNA-PKcs (proteín-kinasa dependiente de ADN) es la fosforilación de la histona H2AX en el dominio de ADN próximo a la rotura de cadena doble a una distancia de un megadalton (Paull et al., 2000). Esto puede proporcionar un estado de la cromatina local requerido para las complejas reacciones de reparación o para reclutar proteínas de reparación. La recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos son las vías principales de reparación. Cuando tras la replicación, una copia idéntica de ADN está disponible, la recombinación homóloga parece ser la elegida; por otra parte, cuando no se dispone de copia de ADN, las células cuentan con la unión de extremos, que es menos precisa. Los mecanismos que se suponen que actúan se explican a continuación (Fig. 6).



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de reparación por recombinación homóloga y unión de extremos (Hoeijmakers, 2001)

Para promover la invasión de la cadena en las secuencias homólogas, la actividad exonucleasa 5'-3' del complejo RAD50/MRE11/NBS1 (también sustrato para la fosforilación por ATM) expone ambos extremos 3' (Petrini, 2000) (paso I). La molécula RPA facilita el ensamblaje de un filamento de la nucleoproteína RAD 51, que probablemente incluye proteínas relacionadas con RAD 51, XRCC2, XRCC3, RAD51B, C y D. RAD52 estimula el ensamblaje del filamento (paso II). RAD 51 tiene la habilidad de intercambiar la cadena sencilla con la misma secuencia de la molécula de ADN de cadena doble. La correcta posición de las cromátidas hermanas mediada por cohesinas probablemente facilita la identificación de una secuencia homóloga. Un candidato para las transacciones cromatínicas complejas es RAD54, miembro de la familia SWI/SNF de las ATPasas dependientes de ADN. Tras la identificación de la secuencia idéntica en la cromátida hermana, se emplea la copia intacta como modelo para reparar adecuadamente los extremos rotos mediante la síntesis de ADN (paso III). Finalmente, los llamados puentes de Holliday se resuelven gracias a la acción de las resolvasas (Khanna y Jackson, 2001; van Gent et al., 2001; Haber, 2000) (paso IV). La recombinación homóloga implica la acción simultánea de un gran número de las mismas moléculas, que se encuentran concentradas en la zona de inducción del daño. Estas incluyen a las proteínas BRCA1y BRCA2 (Scully y Livingston, 2000). Evidencias recientes implican directa o indirectamente a BRCA2 en la traslocación nuclear de RAD51 (Davies et al., 2001).

Las células en la fase G1 tienen solamente el cromosoma homólogo para la reparación por recombinación. Esto puede traer dificultades para encontrar el cromosoma homólogo en el complejo genoma. Además, es potencialmente peligroso tanto como molde para la reparación como para permitir la homocigosidad en mutaciones recesivas. Como alternativa, la reacción de unión de extremos no homólogos simplemente une los extremos de una dsb, sin molde, empleando el complejo de unión de extremos KU70/80 y la DNA-PKcs, seguidas por la unión mediante la ligasa XRCC4 (Khanna y Jackson, 2001; van Gent et al., 2001) (pasos V-VII). La función de KU70/80 puede implicar la protección y la aproximación de los extremos, además de una función de señalización para la DNA-PKcs. La unión de extremos puede ser facilitada cuando están todavía próximos a través de los nucleosomas o de otras estructuras. La unión de extremos está a veces asociada con la ganancia o pérdida de unos pocos nucleótidos si se emplean microhomologías internas



usadas en el apareamiento antes del sellado. Esto implica que se involucren ADN polimerasas y/o nucleasas. Apuntar además, que el complejo KU y la DNA-PKcs está también implicado en la estructura y función del telómero (Khanna y Jackson, 2001; Hsu et al., 2000).



## **TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS ROTURAS DEL ADN**

Una herramienta muy útil en el estudio del daño y reparación del ADN es el empleo de técnicas capaces de medir las roturas de cadena (roturas de cadena sencilla o doble). La importancia en el desarrollo y mejora de estas técnicas es de gran relevancia debido a que pueden aplicarse además en el estudio de otros tipos de lesiones en el ADN, ya que la mayoría de las lesiones se transforman en roturas y por lo tanto esto hace que se puedan cuantificar con las técnicas adecuadas (Ahnström, 1988).

Vista la gran importancia de las técnicas y debido a la gran variedad existente, en este apartado se hará referencia a aquellas que han sido más utilizadas. Con el fin de estructurar el apartado se han dividido en cuatro grupos (técnicas bioquímicas, técnicas morfológicas, técnicas de genética molecular, y técnicas citogenéticas), teniendo en cuenta que puede haber algún solapamiento entre ellas.

### **Técnicas bioquímicas**

#### **Sedimentación en gradiente de sacarosa (neutra o alcalina)**

En un principio, la velocidad de sedimentación se empleó para determinar el tamaño de las macromoléculas ya que en un gradiente de sacarosa los fragmentos de ADN más largos sedimentarán posteriormente a los fragmentos más pequeños (McGrath et al., 1966). Con el tiempo la técnica se utilizó para la detección de roturas en el ADN y se encontraron con el gran problema de la degradación del ADN al ser extraído. Esto se resolvió aplicando un tratamiento alcalino que separaba las hebras y además inactivaba las enzimas celulares y eliminaba las proteínas (Ahnström, 1988). Se basa en que los agentes que dañan el ADN, como la irradiación, generan roturas en el ADN y por lo tanto lo fragmentan. De este modo, las células se marcan previamente con timidina radiactiva, se lisan en una solución alcalina y se depositan en la parte superior del tubo que contiene el gradiente de sacarosa y se centrifuga. Después se recogerán las distintas fracciones y se les medirá la cantidad de radiactividad, calculando la frecuencia de roturas en cada una de las fases. Si se emplea un pH neutro se obtendrá una estima de las roturas de cadena doble y si es alcalino, del conjunto de todas las roturas. Dado que

las roturas de cadena sencilla son más frecuentes tras la irradiación, éstas serán cuantificadas de modo preferente.

La desventaja de esta técnica es su poca sensibilidad porque se obtiene una gran señal de fondo debido a que se han introducido roturas durante la manipulación. Además las moléculas de elevado tamaño tienen una sedimentación anormal en el gradiente de sacarosa.

### **Elución neutra o alcalina**

Esta técnica utiliza filtros para discriminar entre diferentes tamaños de ADN, ya que los filtros actúan mecánicamente impidiendo el paso del ADN. Se puede utilizar para medir tanto roturas de cadena sencilla como doble, lugares lábiles alcalinos, entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas y entrecruzamiento entre hebras del ADN (Kohn et al., 1973; Bradley et al., 1979; Kohn et al., 1981). Los filtros que se utilizan son de policarbonato (útil en la detección de roturas de cadena simple) o de cloruro de polivinilo (útil en la detección de entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas) (Kohn et al., 1981). Primero las células se dejan crecer en medio con timidina radiactiva y se eliminan la mayor parte de las moléculas que no son ADN mediante una solución de lisis, que pasa a través del filtro por gravedad. Después los extremos del filtro se conectan a una bomba peristáltica, se coloca una solución neutra o alcalina, y se van recogiendo fracciones en función del tiempo. La cantidad de ADN retenida en cada fracción se cuantifica por conteo de la radiactividad emitida y se relaciona directamente con el número de roturas. Si se emplea la solución neutra se detectarán roturas de cadena doble y se denomina *elución neutra*. Si se emplea la solución alcalina, se detectarán roturas totales, principalmente las de cadena sencilla y se denomina *elución alcalina*.

### **Desnaturalización alcalina (unwinding alcalino) del ADN y cromatografía de hidroxipatita.**

Esta técnica se basa en que el ADN se desnaturaliza a partir de las roturas, en presencia de álcali, (Ahnström et al., 1974; Rydberg, 1975; Ahnström et al., 1981). Las células, cuyo ADN se marca radiactivamente, se lisan en una solución con detergentes y

alta concentración de sales y el ADN se desnaturaliza a pH elevado. Después de neutralizar, se realiza un tratamiento con ultrasonidos que fragmenta el ADN.

La cantidad relativa de ADN de cadena sencilla y doble contenida en la muestra se determina mediante cromatografía de hidroxipatita (Ahnström et al., 1981), en la cual la columna tiene mayor afinidad por el ADN de cadena doble. El ADN de cadena sencilla se eluye con tampón fosfato, pH 7,  $0,12 \text{ mol / dm}^3$ , mientras que el ADN de cadena doble necesita un tampón fosfato a mayor concentración,  $0,4 \text{ mol / dm}^3$  y citrato a  $10^{-2} \text{ mol / dm}^3$  (von Sontag, 1987). Posteriormente se mide el nivel de radiactividad de las fracciones obtenidas.

Aunque el ADN se mide mediante radiactividad, también se puede realizar con técnicas de fluorescencia (Kanter y Schwartz, 1982). Se podrían incubar las fracciones con Hoechst 33258 y medir la cantidad de ADN como fluorescencia relativa de la muestra con un espectrofluorímetro, calculando posteriormente por calibración el porcentaje de ADN y la cantidad de roturas.

Otro método para discriminar entre roturas de ADN de cadena sencilla y doble es la digestión con nucleasa S1 en la fracción de ADN de cadena sencilla, seguido de una centrifugación del resto del ADN, de doble cadena (Sheridan y Huang, 1977).

### **Técnicas de genética molecular**

#### **Desnaturalización alcalina / Southern blot**

Este método combina la desnaturalización alcalina con el Southern blot. El álcali desnatura el ADN porque rompe los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases. La tasa de desnaturalización es mayor si hay roturas de cadena, porque son lugares de inicio de desnaturalización (Bunch et al., 1992). En esta técnica se realiza una modificación del método de desnaturalización alcalina (Sheridan et al., 1977), donde el ADN desnaturizado se digiere con nucleasa S1, que es una endonucleasa específica de cadena sencilla. Posteriormente se realiza el Southern blot en el ADN resistente a esta nucleasa, y se cuantifica el daño en la región específica, analizando la disminución de la intensidad de la señal emitida por la cantidad de sonda hibridada (Bunch et al., 1992).



Permite detectar inducción y reparación de lesiones en regiones cromatínicas específicas como en el ADN satélite, oncogenes o genes como la  $\beta$ -globina, que debido a sus actividades funcionales pudieran mostrar diferente sensibilidad a la inducción de roturas (Bunch et al., 1995).

La desventaja de esta técnica es que nos proporciona una estima global de la población celular, no pudiendo analizar la posible heterogeneidad intercelular tanto en las lesiones generadas como en la reparación.

### **Electroforesis de campo pulsante en gel de agarosa / Southern blot**

En la electroforesis, los fragmentos de ADN migran debido a su carga negativa y según su peso molecular. La electroforesis en campo eléctrico continuo tiene la limitación de no poder resolver moléculas de ADN mayores de 50 kb (Fangman, 1978). Las moléculas grandes se mueven entonces a través de la matriz del gel con una velocidad que es independiente de su tamaño y forman una banda difusa en el gel. Sin embargo, este problema se solucionó si se reorientaba periódicamente el campo eléctrico. De este modo se podían resolver moléculas de varias megabases (Schwartz y Cantor, 1984; Carle et al., 1986; Chu et al., 1986). En la electroforesis en campo pulsante el campo eléctrico se altera discontinuamente de modo periódico forzando de modo intermitente el cambio de conformación y la dirección de migración de las moléculas. El tiempo que necesita cada molécula de ADN para alterar su conformación y reorientarse es dependiente del tamaño, reorientándose más rápidamente las moléculas de menor tamaño (Ahnström, 1988; Chu, 1991).

Otra diferencia con la electroforesis habitual es que, en la electroforesis en campo pulsante, las muestras (ya sean células completas, núcleos con el ADN relajado o ADN desnudo) no se colocan en los pocillos en forma líquida sino formando pequeños bloques de agarosa que encajan perfectamente en los huecos. De este modo se evitan las posibles roturas en las moléculas de ADN originadas por la manipulación, y la lisis celular se realiza en los bloques de agarosa.

Mediante esta técnica se pueden cuantificar roturas de cadena doble, para lo cual se realiza una comparación entre la muestra y una muestra de ADN de peso molecular

conocido. Además, si se combina con la técnica de Southern Blot se pueden estudiar lesiones en regiones específicas.

### **Técnicas morfológicas**

#### **Traslado de mella “In situ”**

Esta técnica se basa en la adición de nucleótidos marcados (radioactivamente o mediante biotina o digoxigenina) en la región de la rotura (o nick). Primero se cultivan las células en frascos cuya base es un portaobjetos, después se fijan las células en etanol / ácido acético. Seguidamente se incuban las células en una solución de “Nick – translation”, que contiene un tampón, la ADN polimerasa de *E.coli*, una mezcla de 4 desoxinucleótidos trifosfatos conteniendo dTTP marcado radiactivamente con  $^3\text{H}$  u otro nucleótido unido a biotina o digoxigenina. Después se para la reacción con Tris-HCl, se deshidratan los portaobjetos en etanol y se dejan secar al aire. Finalmente los portaobjetos se sumergen en emulsión fotográfica y se dejan en oscuridad a 4°C para obtener la autorradiografía. En caso de usar biotina o digoxigenina se revelan con un fluorocromo o mediante un sistema enzimático. Para terminar, las células se tiñen con hematoxilina y se realiza un conteo de los granos de los núcleos mediante un sistema de análisis de imagen.

Las ventajas de esta técnica son el no requerimiento de grandes cantidades de células, la no modificación de la morfología de las células y la posibilidad de aplicación a una gran variedad de tipos celulares. Es útil para predecir susceptibilidad a la irradiación, hipertermia y agentes químicos (Maehara et al., 1989).

#### **Exonucleasa III-Random Priming**

En esta técnica se emplea la enzima Exonucleasa III que genera cadena sencilla a partir de los puntos donde haya roturas. Se realiza entonces una incubación con secuencias hexaméricas al azar y algunas de éstas serán complementarias a los fragmentos de cadena sencilla generados, uniéndose y formando dúplex que actuarán como cebadores para la enzima klenow (fracción de la polimerasa sin actividad



exonucleasa 5'-3'. De esta manera se añaden nucleótidos marcados y se ponen de manifiesto las zonas de rotura (Gosálvez et al., 1993).

### **TUNEL o marcaje enzimático en extremo de rotura**

Este método permite detectar "in situ" extremos de cadena de ADN 3'-OH en células aisladas. La enzima transferasa terminal (TdT) cataliza la incorporación de nucleótidos marcados en los núcleos fijados, usando los extremos 3'-OH libres. La radiactividad se detecta por autorradiografía y después se cuantifica (Fertil et al., 1984). Esta técnica, sin embargo, no permite cuantificar cualquier tipo de roturas ya que, por ejemplo, las roturas inducidas por peróxido de hidrógeno no parecen marcarse con este método (Kodym et al., 1995).

La desventaja de las técnicas que emplean enzimas es que solamente marcan las roturas accesibles y/o reconocibles por la enzima empleada.

### **Técnica del halo neutro**

Es un test simple que se ha desarrollado para medir el daño ocurrido en el ADN de células individuales. El procedimiento se basa en la evaluación microscópica de los halos de los nucleoides que se adhieren al cubreobjetos. Los nucleoides se obtienen mediante la extracción de las proteínas nucleares con detergentes y/o soluciones salinas altamente concentradas. Se piensa que los halos de los nucleoides son bucles (loops) del ADN libre que proceden del núcleo. Cuando se observan mediante tinción con bromuro de etidio, los halos de los nucleoides primero se expanden y después se contraen a medida que la concentración de etidio aumenta. La exposición de los nucleoides a niveles muy bajos de tratamientos que rompen la cadena de ADN produce un aumento en la expansión de los halos, con lo cual la medición del radio del halo nos da una indicación de la cantidad de roturas (Thomas et al., 1989).

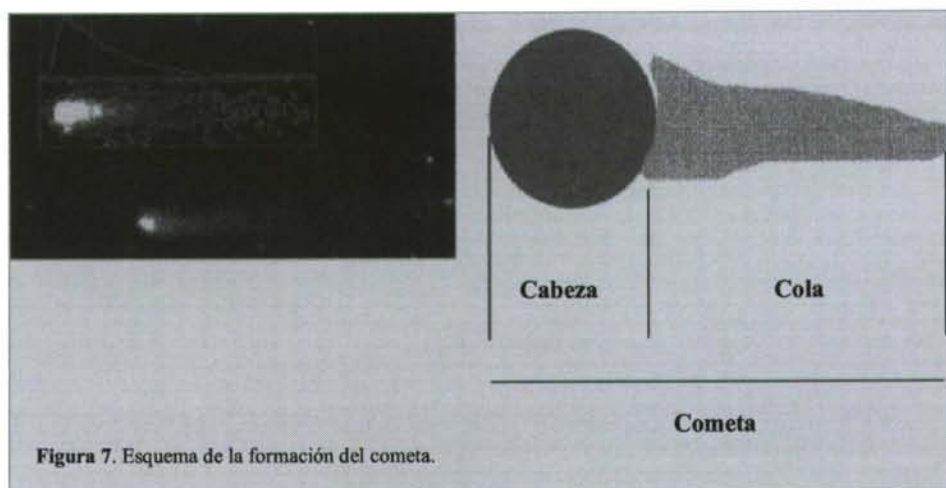
### **Electroforesis en microgel ó Ensayo de cometas**

En 1978 Rydberg y Johansson demostraron que cuando lisaban células en condiciones alcalinas el núcleo permanecía formando una estructura bastante

condensada. Si irradiaban las células con dosis crecientes de rayos X, el núcleo adquiría una estructura cada vez más difusa conforme aumentaba la dosis.

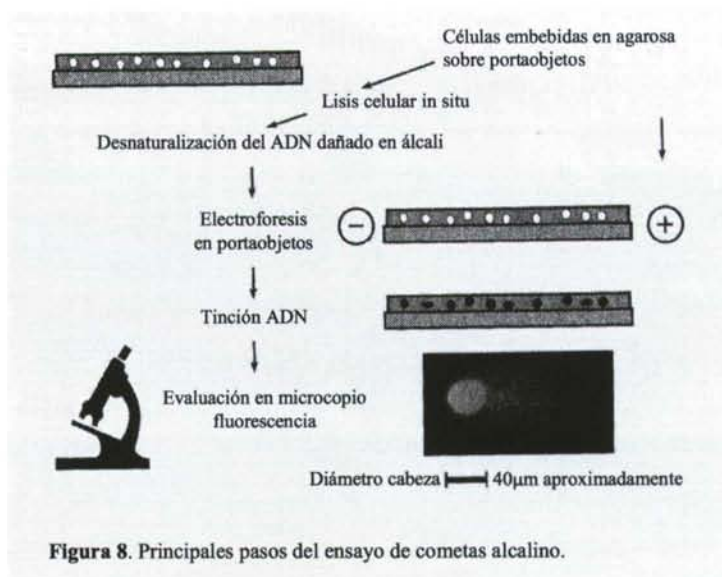
Basándose en estas observaciones, Östling y Johansson en 1984 desarrollaron otro método en el cual las células, en una matriz de agarosa y colocadas sobre un portaobjetos, se lisaban en una solución neutra. Después se realizaba una electroforesis que provocaba que parte del ADN se dirigiera hacia el ánodo. Para visualizar los núcleos, éstos se teñían con Naranja de Acridina. Observaron que a medida que aumentaba la dosis de rayos X aumentaba la fluorescencia a cierta distancia del centro del núcleo.

La solución de lisis, que contiene detergentes, se emplea para la extracción de la mayor parte de las proteínas de la cromatina. El nucleoide resultante, ADN mas proteínas residuales, forma un halo, que será de mayor tamaño cuanto mayor sea el número de roturas. Posteriormente se realiza la electroforesis sobre los nucleoides, con lo cual, la corriente eléctrica empuja el ADN cargado desde el núcleo, de modo que los fragmentos rotos migrarán más lejos (Klaude et al., 1996). Como resultado se obtienen imágenes con aspecto de cometas, con una cabeza y una cola. La cola del cometa obtenida bajo condiciones neutras parece ser el resultado de bucles de ADN que se encuentran unidos a la estructura del núcleo. La longitud y/o la cantidad de ADN que ha migrado hacia la cola es proporcional al número de roturas. Posteriormente los cometas se tiñen con algún compuesto que se intercale en el ADN, como por ejemplo el bromuro de etidio, y de este modo se pueden realizar las mediciones pertinentes con el programa informático adecuado y obtener una estima del número de roturas existentes (Fig. 7). Cuando se emplean condiciones neutras se detectan las dsbs, sin embargo, si se emplean condiciones alcalinas antes y durante la electroforesis, aumenta la sensibilidad en la detección de las lesiones, ya que se facilita la desnaturalización del ADN y permite la detección de ssb (Singh et al., 1988; Olive, 1989).



Los pasos básicos de la técnica son (Fig. 8):

1. Inclusión de las células en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos
2. Lisis de las células in situ
3. Desnaturalización del ADN mediante el álcali
4. Electroforesis en el portaobjetos
5. Tinción del ADN
6. Evaluación mediante microscopía de fluorescencia



Una de las desventajas de esta técnica es la determinación del tiempo de electroforesis, ya que si el tiempo es muy corto no se podrán apreciar bien las diferencias, y si el tiempo es muy largo, el álcali puede dar lugar a un aumento considerable en el número de lesiones. Esto se podría evitar añadiendo antioxidantes o también se podrían utilizar fluorocromos más eficaces. Otra de las limitaciones sería que no se pueden determinar simultáneamente las roturas de cadena sencilla y doble.

### **DBD-FISH (DNA Breakage Detection-FISH)**

La técnica DBD-FISH es una técnica que permite estudiar la heterogeneidad intragenómica e intercelular en la inducción de roturas del ADN (Fernández et al., 1998) o en la cinética de reparación. Por ello, se puede analizar el comportamiento no sólo de todo el ADN de una célula en conjunto, sino también el de secuencias específicas. Las células, contenidas dentro de una delgada capa de agarosa sobre un portaobjetos, se incuban brevemente en una solución alcalina desnaturizante que transforma las roturas del ADN (Bunch et al., 1992; Bunch et al., 1995) en ADN de cadena sencilla. Estos tramos de ADN se originan a partir del extremo de las roturas, y sirven de dianas para la hibridación de las sondas de ADN. A continuación, se para la desnaturización y se eliminan las proteínas con las subsecuentes incubaciones en las soluciones de neutralización y lisis, para así obtener el ADN en una estructura residual similar a un núcleo, denominada nucleóide. Tras los lavados y deshidratación en baños de etanol al 70, 90 y 100 %, el gel se colapsa y seca, permitiendo hibridar y detectar las sondas de ADN, según los protocolos estándar de FISH (Verma y Babu, 1995). Al aumentar las roturas en el ADN en un área concreta, el álcali va a producir más ADNcs y por lo tanto hibridará más sonda en dicha región, dando lugar a una señal de FISH más intensa y/o ampliamente distribuida, la cual puede ser cuantificada con un programa de análisis de imágenes digitales. La especificidad de la sonda va a determinar el área de ADN concreta a estudiar. En resumen, la técnica integra las técnicas habitualmente empleadas en los test del “halo nuclear” o “cola de cometa”, los ensayos de desnaturización alcalina para la detección de roturas del ADN empleados de forma general en estudios radiobiológicos (Ahnström and Erixon, 1973; Rydberg, 1975) y la hibridación in situ fluorescente (Santos et al., 1997).



Mediante DBD-FISH se ha visto que el tiempo de incubación en la solución desnaturalizante alcalina influye en la longitud del tramo de ADN de cadena sencilla generado a partir de una rotura del mismo. Si se aplican tiempos muy cortos no se permite la adecuada difusión del álcali en el microgel (Vázquez-Gundín et al., 2000).

También se ha podido observar que el marcaje basal no es homogéneo en el genoma global. Se han estudiado las secuencias de ADN satélite de 5pb (D1Z1, D9Z3, DYZ1), las secuencias de ADN satélite clásico 1 y los satélites alfoides (D1Z5, DXZ1, todos los centrómeros). Los resultados que se obtuvieron fueron que las secuencias de ADN satélite de 5pb (D1Z1, D9Z3, DYZ1) muestran un elevado marcaje basal. El marcaje es intermedio en las secuencias de ADN satélite clásico 1 y débil en las regiones satélites alfoides (D1Z5, DXZ1, todos los centrómeros). Este resultado hace evidente la existencia de abundantes lugares lábiles alcalinos, que forman parte constitutiva, en la organización nativa, dentro de las secuencias de ADN satélite de 5pb de leucocitos humanos (Fernández et al., 2001b).

También se ha analizado el nivel inicial de daño inducido en el ADN por exposición a rayos X en diferentes secuencias de ADN satélite y en los telómeros. Las familias de ADN satélite estudiadas fueron las secuencias alfoides, y las secuencias de ADN satélite de 5 pb del cromosoma 1 (locus D1Z1), del cromosoma 9 (locus D9Z3) y del cromosoma Y (locus DYZ1). Debido a que la señal de hibridación control fue bastante diferente en cada una de las dianas de ADN, el incremento relativo en la intensidad de fluorescencia total con respecto a los controles no irradiados fue el parámetro que se empleó para la comparación. La irradiación de los nucleoides obtenida tras la eliminación de las proteínas demostró que la solución de desnaturalización alcalina genera alrededor de la mitad de señal cuando las roturas están presentes en las secuencias de ADN satélite clásico de 5 pb, como cuando el mismo número de roturas está presente en el genoma total, mientras que la señal es algo más intensa cuando las roturas están en las secuencias alfoides o en el satélite 1. Después de corregir por las diferencias en la tasa de desnaturalización-renaturalización, los satélites de 5 pb parecen ser los mas sensibles a la rotura que el genoma total, mientras que el ADN correspondiente a las secuencias alfoides y al satélite 1, muestran una sensibilidad similar a la del genoma total. La dosis mínima detectable fue de 0,1 Gy para el genoma total, 0,2 Gy para los alfoides y el satélite 1 y 0,4 Gy para los satélites de 5 pb. Las

secuencias teloméricas aparecieron marcadas al máximo en las células no irradiadas. De este modo, los finales cromosómicos se comportan como extremos de roturas, constituyendo una fuente de señal basal en los ensayos alcalinos (Vázquez-Gundín et al., 2002).

DBD-FISH es una técnica flexible que permite diversas variantes dependiendo del objetivo del experimento, por ejemplo, en la composición, condiciones y orden de incubación de las soluciones de desnaturalización y/o lisis. Esto se detalla con mayor profundidad en Material y Métodos.

### **Técnicas citogenéticas**

#### **Aberraciones cromosómicas estructurales**

Las aberraciones cromosómicas son importantes en cuanto al estudio en humanos del efecto tras la exposición a radiaciones ionizantes y a químicos genotóxicos (Natarajan, 2002).

La técnica consiste en la estimulación con fitohemaglutinina de linfocitos T, (son aproximadamente el 70% de los linfocitos de sangre periférica), que se encuentran en fase G0. Después, las células se detienen en metafase mediante el tratamiento con colchicina. Las células se centrifugan y tras eliminar el sobrenadante, se realiza un tratamiento hipotónico. Se centrifuga de nuevo y se elimina el sobrenadante. Posteriormente se realiza la fijación en metanol-ácido acético (3:1) tres veces. Finalmente se realiza la extensión, dejando caer una gota de la muestra sobre un portaobjetos limpio, y dejando secar al aire. Generalmente se tiñen con Giemsa y se analizan las metafases.

Las radiaciones ionizantes inducen en linfocitos en estadio G0 aberraciones cromosómicas que se pueden clasificar en inestables (anillos céntricos, dicéntricos, fragmentos acéntricos) y estables (translocaciones, inversiones).

### ***La Hibridación In Situ Fluorescente (FISH).***

La hibridación in situ consiste en la hibridación directa de una sonda con el ADN o ARN de cortes citológicos o de cromosomas metafásicos.

En la hibridación in situ sobre cromosomas, éstos se obtienen en metafase, generalmente a partir de linfocitos circulantes, de linfoblastos y a partir de fibroblastos. La hibridación se realiza directamente sobre preparaciones citogenéticas, las cuales se han fijado sobre un portaobjetos y previamente pueden someterse a un tratamiento con ARNasa para destruir el ARNm y/o a una desproteinización mediante la proteinasa K. Hasta hace poco tiempo la hibridación se realizaba con una sonda marcada con un isótopo radiactivo, generalmente con tritio. Pero hoy en día es posible el uso de marcajes no radiactivos, los cuales permiten visualizar directamente las secuencias únicas sin tener que recurrir a recuentos estadísticos. El principio de este sistema consiste en la unión covalente de la biotina al ADN de la sonda o bien de un hapteno como la digoxigenina, los cuales son detectados después de la hibridación mediante la avidina o anticuerpos marcados con fluorocromos o mediante una enzima. La señal común más utilizada es la fluorescente, conocida como FISH. El método permite la visualización simultánea de varias sondas diferentes marcadas por distintos fluorocromos. Los resultados se obtienen en pocos días, siendo una gran ventaja frente a la hibridación radiactiva, la cual necesita varias semanas para su visualización (Baiget et al., 1995).

Hasta hace poco tiempo, para el estudio de las aberraciones cromosómicas se empleaban tinciones sólidas como el Giemsa o Feulgen. Sin embargo, la detección de las translocaciones no se realiza de forma precisa con estas tinciones. Se empleó entonces el bandeado cromosómico, pero la definición alcanzada por la técnica no era suficiente para poder detectar e identificar adecuadamente ciertas translocaciones o reordenamientos complejos. Posteriormente, con la aparición de la técnica de "painting", que permite realizar el FISH marcando un cromosoma completo, se pudieron detectar cromosomas concretos en metafase y analizar por lo tanto de manera más fácil las aberraciones cromosómicas estructurales.



### **PCC (Cromosomas Condensados Prematuramente)**

Es una técnica que permite observar los cromosomas interfásicos (Johson y Rao, 1970; Hittelman y Rao, 1974). Si se fusionan células en interfase con células mitóticas de otro animal, los cromosomas interfásicos se condensan prematuramente. Esta técnica permite analizar la cinética de formación de aberraciones cromosómicas producidas por irradiación. En 1998 Darroudi et al. combinaron la técnica de PCC con la FISH (PCC-FISH) para analizar en células interfásicas el daño en cromosomas concretos.

### **Técnica de los micronúcleos**

Los micronúcleos son fragmentos acéntricos y/o cromosomas que son incapaces de ir a los polos de la célula durante la mitosis. Durante la telofase se forma la envuelta nuclear alrededor de estos fragmentos y cromosomas, lo que les confiere el aspecto de micronúcleos. Los micronúcleos, por lo tanto, proporcionan información acerca de la rotura de cromosomas y de la pérdida de cromosomas.

Para distinguir qué células se han dividido, se emplea citocalasina B. La citocalasina B es un inhibidor de la polimerización de actina, que se necesita para la formación del anillo de microfilamentos que constriñe el citoplasma durante la citocinesis. Por lo tanto, las células que se han dividido se pueden identificar por su aspecto binucleado. Los micronúcleos se cuentan entonces solamente en estas células binucleadas. Permite comparar el daño en los cromosomas entre poblaciones celulares que pueden diferir en su cinética de división celular (Singh et al., 1996). Para poder determinar si los micronúcleos son fragmentos acéntricos o cromosomas enteros se puede emplear la hibridación in situ con sondas específicas (painting, sonda centromérica específica, sonda para todos los centrómeros) o el método del anticuerpo anticinetocoro. Es evidente que los micronúcleos sólo se expresan en células eucarióticas en división, por lo tanto esta técnica no se puede emplear en poblaciones celulares que no se estén dividiendo ni en las que no se posea información acerca de su cinética de división.



### **Intercambio de cromátidas hermanas: SCEs.**

El intercambio de cromátidas hermanas se descubrió a finales de los años 50. Se cultivaban las células durante un ciclo con timidina tritiada, y mediante autorradiografía se observaba que una cromátida se marcaba y la otra no, permitiendo observar además intercambios entre las cromátidas (Taylor, 1958; Das, 1988). Mas adelante se utilizó la bromodeoxiuridina (BrdU) haciendo la técnica más precisa. Se pueden distinguir tres tipos de cromátidas, basándose en que las dos cadenas, una o ninguna pueden incorporar BrdU.

Un aumento en la tasa de SCEs es un indicador del potencial carcinogénico y mutagénico de un agente. Sin embargo existen discrepancias entre la inducción de SCEs y las roturas de cromosomas porque se ha encontrado que, por ejemplo, una dosis de rayos X, que aumenta las roturas de cromosomas unas 20 veces, solamente incrementa 2 veces el nivel de SCEs (Kato, 1977).

# ***Objetivos***

## **OBJETIVOS:**

### **1. Estudio de los lugares lábiles alcalinos constitutivos en el genoma de ratón mediante DBD-FISH**

La técnica DBD-FISH permite detectar daño en el ADN en células aisladas y en regiones concretas (Fernández et al., 1998). En trabajos anteriores se estudió la señal basal en las secuencias específicas de leucocitos humanos de las secuencias satélites de 5 pb (loci D1Z1, D9Z3, DYZ1), en el Satélite 1 y en los satélites alfoides para los cromosomas 1 (locus D1Z5) y X (locus DXZ1) y se encontró una elevada señal basal en los satélites de 5 pb en comparación con el satélite 1, los satélites alfoides o con el genoma global. Esta elevada señal basal era debida a una elevada cantidad de lugares lábiles alcalinos constitutivos en los satélites de 5 pb (Fernández et al., 2001b).

Basándonos en estos trabajos, nos preguntamos:

- ¿Cuál es la señal basal en el ADN del ratón en relación con el ADN humano?
- ¿Existe heterogeneidad intracelular en la sensibilidad al álcali, o es que todas las secuencias dan una misma señal basal en DBD-FISH?

### **2. Evaluación de las roturas de cadena sencilla y doble en el ADN mediante DBD-FISH**

Teniendo en cuenta que la irradiación induce roturas de cadena sencilla de forma mucho más frecuente que las roturas de cadena doble y que en la formación de los cometas neutros el ADN migra en función de las roturas de cadena doble (Fernández et al., 2001a), nos preguntamos:

¿Cómo podríamos, empleando la técnica DBD-FISH, discriminar al mismo tiempo, y en la misma célula, tanto las roturas de cadena sencilla como las roturas de cadena doble?

### **3. Patrones de migración del ADN en electroforesis de células aisladas, incluidas en microgel, en dos dimensiones**

El ensayo de cometas o SCGE es una técnica que permite analizar las roturas y reparación en el ADN de células individuales (Olive, 1999). Sin embargo, el comportamiento electroforético del ADN en el ensayo de cometas no está claro.

Combinando la técnica DBD-FISH con SCGE, ¿es posible poder analizar y entender un poco más en detalle el patrón de migración electroforético del ADN?

### **4. Reparación de las secuencias teloméricas intersticiales en células de hámster chino normales y deficientes en la reparación de roturas de cadena doble**

Como se ha indicado anteriormente, en el hámster chino (*Cricetulus griseus*), se han encontrado bloques de secuencias teloméricas en regiones centroméricas-pericentroméricas en la mayoría de sus cromosomas, comprendiendo cientos de kilobases de ADN en cada cromosoma (Faravelli et al., 1998). En las líneas celulares de hámster chino, las largas ITRS se comportan como lugares preferenciales de rotura cromosómica y de recombinación, tanto espontánea como inducida por radiaciones ionizantes (Pandita y DeRubeis, 1995; Slijepcevic et al., 1996; Bertoni et al., 1996).

Teniendo en cuenta estos trabajos nos preguntamos:

- ¿Cuál será la sensibilidad de las largas ITRS de las líneas celulares de hámster chino a la inducción inicial al daño originado por rayos X?
- ¿Cómo será la cinética de reparación inicial de estas ITRS?, ¿Se modifica esta cinética si existe algún defecto en el mecanismo de reparación?



# ***Material y Métodos***

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MATERIAL**

#### **Reactivos y equipo técnico**

- Agarosa estándar.
- Agarosa de bajo punto de fusión.
- Microscopio de epifluorescencia equipado con los filtros y objetivos apropiados.
- Cámara de alta sensibilidad (CCD) acoplada a un ordenador.
- Software para analizar las imágenes digitales (Visilog 5.1, Noesis).
- Cubeta de electroforesis de 18x36cm.

#### **Soluciones**

##### ***Preparación de los portaobjetos***

- Solución 1 (Lisis 1), con acción neutralizante y de lisis: Tris-HCl 0,4M, DTT 0,8M, SDS 1%, EDTA 0,05M, pH 7,5. Se almacenó a 4°C y se utilizó a temperatura ambiente ó a 42°C.
  - DTT (ditiotreitól): agente reductor que rompe los puentes disulfuro.
  - EDTA (tetraacetato disódico de etilendiamino): agente quelante que captura iones metálicos divalentes. Éstos suelen ser cofactores de las ADNasas de la célula, que al ser liberadas en la lisis con el ADN, podrían degradarlo. Por lo tanto, el EDTA actúa previniendo la degradación enzimática del ADN.
  - Tris-HCl (hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano): tampón que neutraliza el álcali.
- Solución 2 (Lisis 2), con acción neutralizante y de lisis: Tris-HCl 0,4M, NaCl 2M, SDS 1%. Se guardó a 4°C y se utilizó a temperatura ambiente ó a 42°C.
  - SDS (dodecil sulfato sódico) es un detergente iónico que lisa las células y desnaturaliza las proteínas.
  - NaCl (cloruro de sodio): a alta concentración favorece la extracción proteica.

- Solución alcalina de desnaturalización (unwinding): NaOH 0,03M, NaCl 1M, pH 12,2. En algunos experimentos no se utilizó el NaCl, con lo que se obtuvo una solución más suave. Se preparó reciente y se mantuvo a temperatura ambiente o en la nevera a 4°C (para utilizarla posteriormente a 7°C).
- Solución desnaturalizante del ADN: NaOH 0,1M en etanol al 50%, durante 2,5min, temperatura ambiente.
- Solución desnaturalizante para cromosomas en metafase: formamida 70%/2xSSC, pH 7, 70°C, durante 2 min.
- Solución salina isotónica: NaCl 0,9 %. Se utilizó a temperatura ambiente y se guardó a 4°C.
- Tampón reacción nucleasa mung bean: acetato de Na 50mM, NaCl 100mM, ZnCl<sub>2</sub> 1mM, pH 5. Se realizaron 4 incubaciones de 5min cada una, a 22°C.
- Tampón reacción exonucleasa III: MgCl<sub>2</sub> 0,66mM, Tris-HCl 66mM, pH 8. Se realizaron 4 incubaciones de 5min cada una, a 22°C.
- Solución neutralizante: Tris-HCl 0,4M, pH: 7,5. Se utilizó a temperatura ambiente y se guardó a 4°C.
- Tampón TBE: Tris-Borato 0,09M, EDTA 0,002M, pH: 7,5. Se empleó a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C.

## **Enzimas**

- Nucleasa mung bean (BioLabs). Se emplearon 25 unidades en 50µl de tampón de reacción de dicha enzima, a 37°C, durante 45min.
- Exonucleasa III (BioLabs). Se emplearon 100 unidades en 50µl de tampón de reacción de dicha enzima, a 37°C, durante 30min.

## **Sondas de ADN**

Las sondas de ADN para FISH pueden estar marcadas directamente con fluorocromos o con haptenos (e.j. biotina o digoxigenina). Las sondas que se utilizaron fueron las siguientes:

1. *Sondas para la totalidad del genoma* (genoma total), de humanos, de ratón, o de hámster, marcadas con biotina.

Cada sonda de ADN requiere unos tampones de hibridación. La sonda de genoma total (concentración final de 4,3 ng/μl), requiere formamida al 50 %, 2x SSC, 10 % de dextran sulfato y 100mM de fosfato cálcico, pH 7.

2. *Sonda para el genoma total excepto las secuencias teloméricas*, en hámster, marcada con biotina. En este caso, la sonda de genoma total se mezcló con ADN telomérico sin marcar, 50 veces en exceso, generado previamente mediante PCR en ausencia de molde.
  3. *Sonda para todos los Telómeros*, marcada directamente con estreptavidina Cy-3 (Cambio).
  4. *Sonda para el ADN satélite principal* de ratón, marcada directamente con estreptavidina Cy-3 (Cambio).
  5. *Sonda para el satélite alfoide del cromosoma X (locus DXZ1)*, marcada con biotina (Appligene Oncor Cytocell). Los portaobjetos se desnaturalizaron primero en NaOH 0,1M en etanol al 50%, durante 2,5min a temperatura ambiente y luego se hibridaron. El tampón de hibridación requerido fue Hibrisol VI (Appligene Oncor Cytocell): 65% formamida / 2xSSC.
- Soluciones de lavado de las sondas. Deben prepararse todas en el momento de usarlas.

Lavado de sonda para el genoma total, para los telómeros y para el satélite principal:

1. 50% de formamida / 2xSSC, pH 7, 2 lavados de 5min, a temperatura ambiente.
2. 2xSSC, pH 7, 2 lavados de 3min, a temperatura ambiente.

Lavado de sonda DXZ1:

1. 60% de formamida / 2xSSC, pH 7, 2 lavados de 5min, a 42°C.



2. 2xSSC, pH 7, 2 lavados de 3min, a 37°C.

- Solución Bloqueante: 5 % BSA, 4x SSC, 0,1 % Tritón X-100. Se empleó a 37°C durante 5min. Se almacenó en alícuotas a -20°C.
- Reactivos de detección: para las sondas marcadas con biotina se usó estreptavidina-Cy3 (Sigma), preparada fresca en la solución tampón adecuada (1 % BSA, 4x SSC, 0,1 % Tritón X-100) al 1:200. En los casos de cohibridación se empleó avidina DCS-FITC, se preparó también en el momento, en la misma solución tampón (1 % BSA, 4x SSC, 0,1 % Tritón X-100) al 1:400. Se empleó a 37°C durante 30min. El tampón para los anticuerpos se almacenó en alícuotas a -20°C.
- Solución para el lavado de los anticuerpos. Se compone de 4x SSC, 0,1 % Tritón X-100, pH 7. Se realizaron 3 lavados de 2min a temperatura ambiente. Se guardó a 4°C.
- Solución para la contratinción: DAPI (1µg/ml o 2µg/ml) en Vectashield (Vector). Se almacenó a 4°C.

## **MÉTODOS**

### **1. DBD-FISH**

#### ***Gelificación de los portaobjetos***

1. Tras preparar en el microondas la agarosa estándar al 0,65 % en agua, en una jarra Coplin, se mantuvo caliente a 70°C en un baño.
2. Se sumergieron los portaobjetos (tipo estándar) de forma vertical durante 2s y se depositaron inmediatamente sobre una placa metálica fría, en horizontal, para que solidificara la agarosa.
3. Los portaobjetos pasaron luego a una estufa a 80°C hasta que la agarosa se secó por completo, formando una finísima capa firmemente adherida al cristal. Los portaobjetos así tratados se pueden utilizar inmediatamente o almacenar en una caja bien cerrada a temperatura ambiente durante varios meses.

### **Preparación de la muestra**

**Leucocitos de sangre periférica humana.** Se utilizó sangre periférica procedente de donantes sanos. Se extrajo de vía venosa en tubo de 5 ml con anticoagulante EDTA. Se dejó sedimentar unos minutos a temperatura ambiente, hasta que se formó una capa de plasma ("buffy-coat") suficiente para la realización del experimento, aproximadamente 1 ml. Esta capa, contiene células blancas, con plaquetas y algunos eritrocitos, que no interfieren en el estudio porque carecen de material genético, y son eliminados por las soluciones de lisis.

**Líneas celulares humanas MO59J** (deficiente en la reparación de roturas de cadena doble) y **MO59K** (línea parental). Son células con morfología de fibroblastos, aisladas de un tumor de un hombre de 33 años, correspondiendo a un glioblastoma maligno no tratado. Las líneas celulares crecieron en monocapa, en oscuridad, a 37°C, en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal 10%, con antibióticos y con L-glutamina. Las células se despegaron mecánicamente y se resuspendieron en medio RPMI. Las células se irradiaron durante el crecimiento exponencial.

**Esplenocitos de ratón.** Los ratones utilizados en el estudio fueron los descritos por Zhu et al., 1996. Se prepararon suspensiones celulares en medio RPMI mediante disgregación mecánica de los bazo. Los esplenocitos se recogieron en un tubo eppendorf de 1,5ml, después de sedimentar durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Finalmente se centrifugó a 3.480 r.p.m. durante 5min y las células del pellet se resuspendieron en medio RPMI.

**Líneas celulares de hámster chino.** Se emplearon dos líneas control (CHO9 y V79), dos líneas mutantes sin actividad DNA-PKcs (XR-C1 y XR-C2) y una línea mutante en Rad 51C (CL-V4B). Las líneas celulares crecieron en monocapa, en oscuridad, a 37°C, en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal 10%, con antibióticos y con L-glutamina. Las células se despegaron mecánicamente y se resuspendieron en medio RPMI. Las células se irradiaron durante el crecimiento exponencial.

Una vez que se tienen las muestras, se observaron al microscopio óptico para ajustar la cantidad de células diluyendo o concentrando si fuera necesario. Esto fue necesario porque si la cantidad de células era muy elevada se dificultaba la captura de imágenes al microscopio ya que la mayor parte de las células tendrían fibras entremezcladas y sería difícil encontrar células separadas unas de otras. Si por el contrario, hubiera muy poca concentración celular, también se prolongaría el tiempo de toma de imágenes.

### ***Formación de los microgeles***

1. Se preparó una agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en agua por calentamiento en un microondas, y se mantuvo a 37°C, en un tubo de cristal, en un baño.
2. La muestra, a la concentración adecuada, se mezcló cuidadosamente con una micropipeta con la agarosa de bajo punto de fusión a 37°C, de modo que al final estaba a una concentración del 0,7 %. Es importante que la temperatura de la agarosa no sea superior a 37°C para no dañar a las células.
3. Se pipetearon 50µl, 15µl, 10,7µl u 8µl de la suspensión celular en agarosa, sobre la superficie del portaobjetos gelificado. A continuación se cubrió con un cubreobjetos de 24x60mm, de 10x60mm, 22x22mm o de 18x18mm, respectivamente, tratando de evitar la formación de burbujas. Esto se realizó sobre una placa metálica fría.
4. Los portaobjetos se enfriaron a 4°C durante unos 5min para una adecuada solidificación de la agarosa.
5. Se procedió a retirar los cubreobjetos, con mucho cuidado para no desprender el microgel del portaobjetos. En los casos de inducción de daño mediante irradiación, el cubreobjetos no se retiró hasta después de la irradiación.

### ***Inducción del daño en el ADN***

#### ***1. Rayos X***

Para inducir roturas en el ADN, se empleó radiación ionizante. El tipo de irradiación empleada fue rayos X. Se empleó una máquina Philips RT-100 utilizada en tratamientos de radioterapia superficial en el Centro Oncológico de Galicia. Se utilizó un filtro de Aluminio de 1,70mm, que deja pasar una energía de 100Kvp, se empleó un

colimador de 7x7 a una distancia de 10cm. La tasa de irradiación bajo estas condiciones es de 10 Gy / min.

Durante la irradiación los portaobjetos se colocaron sobre una superficie fría para evitar la reparación celular. En cada portaobjetos, una parte del gel no fue sometida a irradiación, teniendo así un control no radiado que siguió los mismos pasos y condiciones que las muestras tratadas.

Después de irradiar, el transporte de los geles se realizó también sobre una superficie fría para evitar la reparación, y después se colocaron en una nevera a 4°C durante unos minutos para posteriormente sacar los cubreobjetos.

Cuando se administraron diferentes dosis de irradiación, por ejemplo para la realización de curvas dosis-respuesta, se aplicaron las dosis sobre el mismo portaobjetos, en líneas transversas a lo largo del portaobjetos, estando el portaobjetos situado bajo hielo, para mantenerlo frío pero sin que lleguen a congelarse las células.

En el caso de experimentos de reparación, se irradiaron las células en monocapa bajo hielo y posteriormente se cambió el medio, a 37°C, dejando actuar a la maquinaria de reparación celular durante diferentes tiempos entre 0 y 60min.

## *2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se empleó para ver el efecto interactivo entre los rayos X y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En este caso se irradió la mitad del portaobjetos como se ha descrito anteriormente y tras la irradiación, mediante la colocación de un cubreobjetos de plástico se trató con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incubando a 4°C durante 5min, una zona del portaobjetos que contenía una zona no irradiada y una zona irradiada.

## *Neutralización y lisis*

1. Se sacó el cubreobjetos y el portaobjetos se situó inmediatamente en una bandeja con abundante solución de lisis 1. Dependiendo del experimento se varió tanto la temperatura como el tiempo de exposición a esta solución.



- 42°C, 45min, en el caso del experimento de los leucocitos humanos y de las líneas celulares humanas MO59K y MO59J y de hámster chino.
  - En el caso de los esplenocitos de ratón y de los leucocitos humanos, éstos no pasaron por esta solución.
  - 22°C, 30min, en el experimento de los modelos de migración del ADN mediante electroforesis en gel en dos dimensiones.
  - 22°C, 20 min, en el caso del marcaje de ADN desapareado en CHO9.
2. A continuación el portaobjetos se situaron en una bandeja con abundante solución 2. En este caso también se varió, dependiendo del experimento, tanto la temperatura como el tiempo de exposición a esta solución.
- 42°C, 45min en el caso del experimento de los leucocitos humanos y de las líneas celulares humanas MO59K y MO59J y de hámster chino.
  - 22°C, 20min, en el caso de los esplenocitos de ratón y de los leucocitos humanos.
  - 22°C, 30min, en el experimento de los modelos de migración del ADN mediante electroforesis en gel en dos dimensiones.
  - 22°C, 10 min, en el caso del marcaje de ADN desapareado en CHO.

### **Lavado**

Se realizó un lavado en solución salina isotónica, o en tampón TBE, durante 10min.

### **Electroforesis**

En los experimentos que se realizaron cometas, los portaobjetos se sitúan sobre la cubeta de electroforesis llena de una solución neutra (tampón TBE) o alcalina (NaOH 0.03M), se ajustaron las condiciones a 20V (0.7V/cm), 12mA (85mA cuando realizó electroforesis alcalina), durante un periodo de tiempo que varió entre 2-15min (ver tabla 2). En el experimento de modelos de migración del ADN mediante electroforesis en gel

en dos dimensiones, en la segunda electroforesis los portaobjetos se situaron en la cubeta de electroforesis girándolos 90° respecto a la posición inicial.

### ***Unwinding alcalino***

La solución alcalina de unwinding se preparó reciente, dependiendo del experimento se varió la composición, tiempo y temperatura:

- En el caso de los leucocitos humanos y de las líneas celulares humanas MO59K y MO59J y de hámster chino, se empleó la solución sin NaCl, durante 2,5min a 7°C.
- En el caso de la comparación entre los esplenocitos de ratón y de los leucocitos humanos se realizaron dos variantes, una con el unwinding con NaCl, durante 2,5min a 7°C, y otra con el unwinding sin NaCl, durante 2,5min a 22°C (esta es menos desnaturizante).
- En los experimentos de los modelos de migración del ADN mediante electroforesis en gel en dos dimensiones, se empleó el unwinding con NaCl, durante 2,5min a 22°C. En el otro experimento no se realizó unwinding, y tras la deshidratación, se realizó una desnaturización en NaOH 0,1M en 50% etanol, durante 2,5 min.

### ***Neutralización***

Los portaobjetos se sumergieron en la solución neutralizante a temperatura ambiente, durante 5min.

### ***Lavados y deshidratación***

1. La siguiente solución a la que se transfirieron los portaobjetos es el tampón TBE (o la solución salina isotónica), en el cual se realizó un lavado a temperatura ambiente.

2. Los portaobjetos se transfirieron secuencialmente a baños de etanol de 2 min. a los siguientes porcentajes, 70, 90 y 100 %. Todos a temperatura ambiente.
3. Tras el último alcohol, los portaobjetos se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Esto causa el colapso de la capa de agarosa, con los nucleoides en su interior. Después del secado, los portaobjetos se podían emplear inmediatamente para hibridar o se podían almacenar en oscuridad y a temperatura ambiente al menos durante un mes.

ESPLENOCITOS RATÓN- LEUCOCITOS HUMANOS	LEUCOCITOS HUMANOS/LÍNEAS MO59J/MO59K	COMETAS BIDIMENSIONALES	LÍNEAS CELULARES CHO	MARCAJE REGIONES ADN DESAPAREADO EN CHO
	IRRADIACIÓN	IRRADIACIÓN	(IRRADIACIÓN)	
	LISIS 1 45min-42°C	LISIS 1 30min-22°C	LISIS 1 45min-42°C	LISIS 1 20min-22°C
LISIS 2 20min-tª ambiente	LISIS 2 45min-42°C	LISIS 2 30min-22°C	LISIS 2 45min-42°C	LISIS 2 10min-22°C
NaCl 10min	NaCl o TBE 1X	TBE 1X 2min	NaCl o TBE 1X (IRRADIACIÓN)	TBE 1X y NaCl
	(Electroforesis-NaCl)	Electroforesis neutra 20V-12mA-12,5min-22°C	(Electroforesis neutra) (20V-12mA-15min-22°C)	
UNWINDING ALCALINO Con NaCl 2,5min 7°C sin NaCl 2,5min 7°C	UNWINDING ALCALINO sin NaCl 2,5min 7°C	(UNWINDING ALCALINO) con NaCl 2,5min 22°C	UNWINDING ALCALINO sin NaCl 2,5min 7°C	
				Tampón mung bean x4-5min 22°C
				mung bean Tampón mung bean 45min 37°C
				Tampón exonucleasa III x4- 5min 22°C
				exonucleasa III Tampón exonucleasa III 30min 37°C
		90°-Electroforesis alcalina (20V-85mA- 4min-22°C) o neutra (20V-12mA- 4min-22°C)		
Tris-HCl 0,4M 5min, 22°C	Tris-HCl 0,4M 5min, 22°C	Tris-HCl 0,4M 5min, 22°C	Tris-HCl 0,4M 5min, 22°C	
TBE 1X 2min	TBE 1X 2min	TBE 1X 2min	TBE 1X 2min	TBE 1X 2min
ALCOHOLES 2min/cada uno	ALCOHOLES 2min/cada uno	ALCOHOLES 2min/cada uno	ALCOHOLES 2min/cada uno	ALCOHOLES 2min/cada uno

**Tabla 2.** Secuencia de pasos para el tratamiento de las muestras en los diferentes protocolos empleados. Los pasos entre paréntesis indican que en unos casos se realizaron y en otros no.



### **Hibridación con sondas de ADN**

Las sondas desnaturalizadas o de una sola hebra, ya estaban marcadas directamente con fluorocromos o con haptenos, y se aplicaban sobre los portaobjetos secos. En principio se podía utilizar cualquier tipo de sonda.

1. Las sondas de ADN de doble cadena se desnaturalizaron con sus respectivos tampones, a 70°C, 8min, en un tubo eppendorf sumergido en un baño termostático. Transcurrido este tiempo se pasaron inmediatamente a hielo unos 2-3min.
2. Para un cubreobjetos de 24x60mm se aplicaron 30µl de la sonda sobre el portaobjetos, y para un cubreobjetos de 10x60mm se aplicaron 15µl. Al menos se podían hibridar dos sondas o combinaciones de sondas, al mismo tiempo, en un portaobjetos, siempre que las condiciones de hibridación, incubación y lavados fueran los mismos.
  - En el caso de los **leucocitos humanos y de las líneas celulares humanas MO59K y MO59J** se empleó sonda para el genoma total marcada con biotina mediante Traslado de Mella ("Nick Translation").
  - En el caso de los **esplenocitos de ratón y de los leucocitos humanos** se utilizó sonda para el genoma total de ratón o de humanos, respectivamente, marcada con biotina mediante Traslado de Mella (Nick Translation). También se utilizó una mezcla de la sonda para el genoma total de ratón, marcada con biotina, con sonda para el ADN satélite principal de ratón, marcada con Cy-3.
  - En el experimento de los **modelos de migración del ADN** mediante electroforesis en gel en dos dimensiones, se empleó sonda para el genoma total humano marcada con biotina y sonda para el satélite alfoide del cromosoma X, marcada con biotina (DXZ1).

- En el caso de las **líneas celulares de hámster chino** se utilizó sonda para el genoma total de hámster marcada con biotina, y también se utilizó sonda para todos los telómeros marcada con Cy-3. También se empleó una mezcla de ambas sondas y sonda para el genoma total, bloqueando las secuencias teloméricas. Para esta última, el ADN telomérico se cortó mediante incubación con la ADNasa I. Se combinó con la sonda para el genoma total, se desnaturalizaron juntas y se permitió una pre-asociación 15min a 37°C. Este paso fue necesario para la supresión de la señal de las secuencias teloméricas en la sonda de genoma total.
3. El portaobjetos con la sonda se incubó toda la noche, en oscuridad, a temperatura ambiente, en una cámara húmeda.

#### ***Lavado de las sondas***

1. El cubreobjetos se sacó sumergiendo cuidadosamente el portaobjetos en vertical la solución de lavado correspondiente.
2. La sonda que no se unió se eliminó en los lavados sucesivos con las soluciones de lavado que contenían formamida/SSC la primera y SSC la segunda solución, agitando delicadamente.
  - En el caso de la sonda para el genoma total humano, para el telómero de ratón y la sonda para el satélite principal, se realizaron dos lavados en 50% formamida / 2xSSC, pH 7, temperatura ambiente, 5min cada uno, seguidos de dos lavados en 2xSSC, pH 7, a temperatura ambiente, 3min cada uno.
  - En el caso de la sonda DXZ1 se realizaron 2 lavados en 60% de formamida / 2xSSC, pH7, 42°C, de 5min, seguidos de 2 lavados en 2xSSC, pH7, a 37°C, 3min.
3. Después de los lavados de la sonda, los portaobjetos se pasaron un instante por una solución de lavado de anticuerpos.

4. Se extrajo el portaobjetos de dicha solución de lavado y se dejó escurrir el exceso de fluido por los bordes. A continuación, se contratiñeron los portaobjetos que fueron incubados con sondas marcadas directamente con fluorocromos, mientras que aquellos cuyas sondas poseen haptenos (por ej. biotina), se sometieron a los subsiguientes pasos de detección.

#### ***Detección de las sondas***

1. Se pipetearon 100µl de solución bloqueante sobre el portaobjetos y luego se cubrieron con un cubreobjetos de plástico, incubando 5min a 37°C en una cámara húmeda.
2. Se eliminó el cubreobjetos y se ladeó el portaobjetos para permitir drenar el exceso de fluido.
3. Se añadieron 100µl de una solución con un reactivo de detección, formada por la proteína antibiotina, conjugada con el fluorocromo deseado, estreptavidina-Cy3 o avidina DCS-FITC, dependiendo del caso, disuelta en la solución de anticuerpos. Se cubrieron con un cubreobjetos plástico e incubaron durante 30min en una cámara húmeda a 37°C.

Los protocolos estándar de FISH suelen requerir la amplificación de las señales. Sin embargo, con la técnica DBD-FISH, ya que se eliminan las proteínas con las soluciones de lisis, el acceso de los reactivos de detección a las secuencias respectivas, se ve facilitado, por lo que no se suele realizar la amplificación.

4. Después de eliminar el cubreobjetos, se incubaron suavemente en solución de lavado (4T) a temperatura ambiente, 3 lavados de 2min cada uno.
5. Se eliminó el exceso de fluido desde el borde.

### ***Tinción de los nucleoides y visualización al microscopio***

1. Con una micropipeta se añadieron 30µl de solución de contratinción DAPI (2µg/ml). Ésta se cubrió con un cubreobjetos de cristal de 24x60mm evitando la formación de burbujas.
2. Los nucleoides teñidos con DAPI se visualizaron al microscopio de epifluorescencia utilizando objetivos 10x, 40x y 100x y un filtro específico. La señal de DBD-FISH se observó con los objetivos de 40x y 100x, utilizando los filtros de fluorescencia apropiados (filtro “rojo” para Cy3, filtro “verde” para FITC y filtro “azul” para el DAPI).

### ***Obtención de las imágenes***

Con una cámara CCD de alta sensibilidad, como la Ultrapix-1600 Astrocám, se tomaron y digitalizaron las imágenes fluorescentes. Tiene un formato de resolución espacial de hasta 1536 x 1024 pixels y distingue más de 16.000 niveles de gris.

1. Las imágenes se adquirieron utilizando un nivel de resolución intermedio.
2. El tiempo de exposición para la captura de las imágenes fue determinado por las señales con las intensidades más alta y más baja de todo el experimento. La señal más fuerte no debía estar saturada en el nivel de gris dentro de su campo, y la menor debía discriminarse claramente (en estos casos utilizamos 500ms). Siempre se utilizó el mismo objetivo (100x) y magnificación de zoom (0,90x). Todas las imágenes tomadas a continuación se adquirieron al mismo nivel de resolución y tiempo de exposición.
3. Antes de tomar las imágenes hubo que realizar dos pasos de calibrado:
  - Se adquirió una imagen de referencia del nivel de fondo oscuro, correspondiente al ruido electrónico detectado por la cámara CCD bajo las condiciones específicas de captura de imágenes.



- En un área del portaobjetos sin señal de FISH, se tomó una imagen “flatfield”. Deben usarse las mismas condiciones, filtro y objetivo que para las imágenes de DBD-FISH. Es una imagen de referencia para las variaciones en la iluminación dentro del campo de visualización de la muestra debida a la autofluorescencia por la óptica del microscopio, sensibilidad de la cámara CCD y fuentes externas. Cada portaobjetos deberá tener su propia imagen “flatfield”.
4. Se adquirieron grupos de 50 imágenes de las señales de DBD-FISH seleccionadas al azar para cada punto experimental.
  5. Cada imagen de la secuencia se corrigió con las dos imágenes de referencia obtenidas previamente.
  6. Dicha secuencia se grabó en un archivo bajo el formato de la cámara (.apf).
  7. A continuación se capturó una nueva secuencia de imágenes de otro punto experimental, se realizaron las correcciones oportunas, se archivaron y así sucesivamente.
  8. En nuestro caso, cada una de las secuencias de imágenes que se analizaron se exportaron desde su formato .apf a un archivo del tipo .img (imager 2), ya que el sistema de análisis de imágenes digitales no es capaz de operar con el tipo de archivo de la cámara. La transformación no modifica los niveles de gris, y cada imagen aparece numerada y por separado.

### ***Análisis de las imágenes***

Las imágenes obtenidas con la cámara CCD se analizaron utilizando un software para análisis adecuado. Nosotros diseñamos dos rutinas semiautomáticas que funcionan bajo un sistema abierto como el Visilog 5.1 (Noesis). Una de las rutinas se dedicó al análisis de las grandes señales extendidas de DBD-FISH de la sonda de genoma total, mientras que la otra se empleó para analizar las típicas señales de puntos que se obtuvieron con el resto de las sondas.

Los principales pasos en el sistema de análisis fueron:

1. Selección del área de interés dentro de toda la imagen. Ésta era generalmente un rectángulo seleccionado por el operador en la región que contiene la señal específica a analizar, e incluía la fluorescencia basal circundante.
2. Determinación del umbral para obtener una imagen binaria. Se elegía un nivel de gris de segmentación para separar la señal de DBD-FISH de la del fondo. Los niveles más altos de gris correspondían a la señal fluorescente, y los más bajos al fondo.
3. Para cada pixel, se sustrajo automáticamente el nivel medio de gris del fondo a su propio nivel de gris de la señal de DBD-FISH.
4. Se midieron tres-cuatro variables para cada señal de DBD-FISH y se exportaron como archivos .txt a una hoja de Excel para su análisis estadístico.
  - **Área (A):** número de pixels. Las roturas en el ADN provocaron la relajación de los bucles del nucleoide, incrementando el área de la señal.
  - **Intensidad Media de Fluorescencia (MFI):** Nivel medio de gris de todos los pixels.
  - **Intensidad total de Fluorescencia (WFI=A x MFI):** Es la suma de los niveles de gris de todos los pixels que abarca la señal de DBD-FISH.
  - **Longitud del cometa:** longitud medida desde el extremo de la cabeza del cometa hasta el extremo de la cola.

### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos se transportaron a un archivo estándar de Excel. Cada grupo de datos se archivó en un fichero específico con todos los datos identificativos correspondientes, y se realizó el análisis estadístico.

Empleando la estadística descriptiva proporcionada por el software de este programa, se calcularon la media, varianza, desviación típica, coeficientes de variación, etc. Además se realizaron análisis de la varianza entre los distintos grupos de datos, (ANOVA de una y dos vías,  $p < 0.05$ ). Con las medias se realizaron las gráficas pertinentes y se determinaron las rectas de regresión y ajustes de la recta, con sus valores de desviación.

## **2. FISH EN METAFASES**

### ***Preparación de la muestra***

Las células L929 de ratón se crecieron en monocapa a 37°C en medio RPMI suplementado con 15% de suero bovino fetal, antibióticos y L-glutamina. Las células se detuvieron en metafase mediante el tratamiento con colchicina 0.5µg/ml, durante 3 horas.

Las células se pasaron a un tubo de cristal y se centrifugan a 1.100 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el sobrenadante se realizó el tratamiento hipotónico con KCl 0,075M, a 37°C, 8 min.

Se centrifugó de nuevo y se eliminó el sobrenadante. Se realizó la fijación en Carnoy frío, metanol : ácido acético (3:1), se mezcló y se centrifugó, repitiendo el proceso tres veces.

El último pellet se dejó con algo de Carnoy para realizar la extensión. Ésta se realiza dejando caer una gota sobre un portaobjetos limpio, y dejando secar al aire.

### ***Desnaturalización***

Las extensiones de cromosomas siguen un protocolo algo diferente del descrito hasta ahora, ya que siguen el protocolo de FISH convencional.

Los portaobjetos se dejaron una hora en una cámara húmeda a 37°C con unas gotas de 2xSSC recubiertas con un parafilm. Pasado este tiempo se deshidrataron con alcoholes fríos al 70, 90 y 100% durante 5min cada uno. Tras secar se pasaron por una solución de desnaturalización (2xSSC, 70% formamida) a 69°C, 2min. Se volvieron a deshidratar (2min cada alcohol) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### ***Hibridación***

Una vez que las extensiones citogenéticas están desnaturalizadas, se procedió a la hibridación con sondas, que se realizó del mismo modo a como se realizó en el protocolo de DBD-FISH: se mantuvo la sonda a 70°C durante 8min, después se pasó a hielo 2-3min y se incubó durante toda la noche en los portaobjetos, a temperatura ambiente. En las células de ratón, se co-hibridaron la sonda para el ADN satélite principal de ratón, marcada con Cy-3, y la sonda para el genoma total, marcada con biotina. Esta mezcla se desnaturalizó del mismo modo como se ha descrito en el protocolo de DBD-FISH, a 70°C durante 8min, después se pasó a hielo 2-3min y se incubó durante toda la noche en los portaobjetos, tanto a 37°C, como a temperatura ambiente.

### ***Lavado***

Los portaobjetos se lavaron de modo similar al descrito en el protocolo de DBD-FISH, con la única diferencia de se deben agitar vigorosamente los portaobjetos en las soluciones de lavado. Se lavaron dos veces en formamida al 50% / 2xSSC, pH 7, 5min, y dos veces en 2xSSC, pH 7, 3min. Los portaobjetos hibridados a 37°C se lavaron también a esta temperatura, mientras que los portaobjetos hibridados a temperatura ambiente, se lavaron a temperatura ambiente.



### ***Detección de sondas***

La sonda para el genoma total se detectó mediante la incubación con avidina (1:400) marcada con FITC, durante 30min. La sonda para el ADN satélite principal ya estaba marcada con Cy-3.

### ***Tinción de los cromosomas y visualización al microscopio***

Con una micropipeta se añadieron aproximadamente 18µl de solución de contratinción DAPI (1µg/ml) al portaobjetos. Éste se cubrió con un cubreobjetos de cristal de 22x22mm evitando la formación de burbujas.

Del mismo modo que se hizo con el DBD-FISH, las señales fluorescentes de los cromosomas se capturaron con el mismo equipo de microscopía y cámara digital. Las señales capturadas se sometieron también a las correcciones de iluminación debidas a errores de la óptica, y una vez transportadas como archivos .img, analizadas con el software Visilog 5.1 para obtener los valores de área, intensidad media e intensidad total de la señal.

La intensidad de la señal media de la sonda del genoma global en las regiones pericentrómericas y en los brazos de los cromosomas se estableció en 10 cromosomas de 10 mitosis procedentes de portaobjetos hibridados a temperatura ambiente o a 37°C. Para este fin, se determinó un perfil de la intensidad de pixels a través de la selección de una línea a lo largo del eje cromatínico, utilizando el plot view de la cámara.

### **3. MARCAJE DE REGIONES DE ADN DESAPAREADO**

En el caso de las células de hámster chino, tras las lisis, los portaobjetos se lavaron en tampón TBE y se incubaron en NaCl 0.9% durante 5min y después en exceso tampón de reacción de nucleasa mung bean (Na acetato 50mM, NaCl 100mM, ZnCl<sub>2</sub> 1mM, pH 5), 4 veces durante 5min. Después, la mitad del portaobjetos se incubó con 25 unidades de nucleasa mung bean (BioLabs), nucleasa que digiere fragmentos de ADN de cadena sencilla, en 50µl de buffer de reacción, durante 45min a 37°C, mientras

que la otra mitad se incubó con tampón de reacción de mung bean, durante 45min a 37°C. Previamente ambas mitades del microgel fueron separadas, rascando con una espátula. Después de esto, los nucleoides se incubaron con tampón de exonucleasa III, (MgCl<sub>2</sub> 0,66mM, Tris-HCl 66mM, pH 8), 4 veces durante 5min. La mitad del portaobjetos, incluyendo un área del microgel previamente incubada con nucleasa mung bean y un área incubada solamente con tampón de reacción de mung bean, se incubaron con 100 unidades de exonucleasa III (BioLabs) en 50µl de tampón de reacción, durante 30min a 37°C. La exonucleasa III transforma los extremos 3'-OH resultantes de la digestión con la nucleasa mung bean en tramos de ADN de cadena sencilla. El resto del portaobjetos se cubrió exclusivamente con tampón de exonucleasa III. Después de 5min de lavado en tampón TBE, los portaobjetos se deshidrataron en etanol y se dejaron secar al aire. El ADN de cadena sencilla generado por la exonucleasa III se detectó mediante hibridación con una mezcla de sonda de genoma total y de telómero. Esto es equivalente al FISH con una desnaturalización enzimática (Gosálvez et al., 2002). El incremento en la señal de hibridación tras la secuencia nucleasa mung bean-exonucleasa III comparado con la exonucleasa III solo será dependiente del ADNcs extra generado por la exonucleasa III en los segmentos de ADN sin emparejar eliminados por la nucleasa mung bean.

# *Resultados y Discusión*

***1. Estudio del ADN satélite principal  
de ratón mediante DBD-FISH***



En este estudio se quiere analizar, mediante DBD-FISH, cómo es la señal basal en el ADN de ratones y si existe alguna secuencia repetitiva responsable mayoritaria de la señal basal y que implique la presencia de lugares lábiles alcalinos constitutivos, al igual que se observó en los satélites de 5 pb humanos (Fernández et al., 2001b).

Para lograr nuestros objetivos, primero realizamos una comparación entre las señales basales que obtuvimos tanto en los leucocitos humanos como en los esplenocitos de ratón, después de hibridar con sonda para el genoma total. El protocolo que se siguió está descrito en Material y Métodos (tabla 2). En la figura 9 y en la tabla 3 podemos observar la señal basal que se obtuvo tanto en los leucocitos humanos como en los esplenocitos de ratón al hibridar con sonda para el genoma total.

Se utilizaron dos condiciones desnaturalizantes, una menos restrictiva (desnaturalización alcalina con NaCl a 7°C) y otra más restrictiva (desnaturalización alcalina sin NaCl a 22°C). El empleo de la condición desnaturalizante más restrictiva no modificó el área de la señal obtenida ni en los leucocitos humanos ni en los esplenocitos de ratón (t-Student,  $p < 0,05$ ), en comparación con lo que se obtuvo con la desnaturalización alcalina menos restrictiva.

Sin embargo, la desnaturalización sin NaCl a 22°C provocó una disminución de la intensidad de fluorescencia media y total en el caso de leucocitos humanos aproximadamente en 27 veces (relación desnaturalización con NaCl a 7°C/ desnaturalización sin NaCl a 22°C en la intensidad media de fluorescencia y total: 1,32/0,05; 5061,60/182,35).

En el caso de los esplenocitos de ratón la disminución de la intensidad de fluorescencia media y total fue de solamente 3,6 veces (relación desnaturalización con NaCl a 7°C/ desnaturalización sin NaCl a 22°C en la intensidad media de fluorescencia y total: 2,64/0,72; 32274,37/9085,74).

Aunque ambos tipos celulares tienen más o menos un tamaño de genoma de aproximadamente 6.000 Mb por núcleo diploide (Strachan, 1999), los esplenocitos de ratón, en comparación con los leucocitos humanos, presentan en ambos protocolos de

desnaturalización una señal basal de tamaño 3 veces mayor (relación entre áreas en las mismas condiciones desnaturalizantes ratón/humano: 12,05/4,04; 12,28/3,65).

Además, si comparamos la intensidad media de fluorescencia entre las células de ratones y de humanos se produce un aumento de 2 (relación intensidad media de fluorescencia de ratón/intensidad media de fluorescencia humano en solución desnaturalizante con NaCl a 7°C: 2,64/1,32) a 15 veces (relación intensidad de fluorescencia media de ratón/intensidad media de fluorescencia humano en solución desnaturalizante sin NaCl a 22°C: 0,72/0,05) al emplear las condiciones desnaturalizantes más restrictivas.

Del mismo modo, al comparar las intensidades de fluorescencia total, se observa un aumento de 6 (relación intensidad total de fluorescencia de ratón/intensidad total de fluorescencia de humano en solución desnaturalizante con NaCl a 7°C: 32274,37/5061,60) a 50 (relación intensidad total de fluorescencia de ratón/intensidad total de fluorescencia de humano en solución desnaturalizante sin NaCl a 22°C: 9085,74/182,35) veces.

Los dos tipos celulares se procesaron simultáneamente en el mismo portaobjetos para evitar las posibles variaciones entre experimentos o entre portaobjetos.

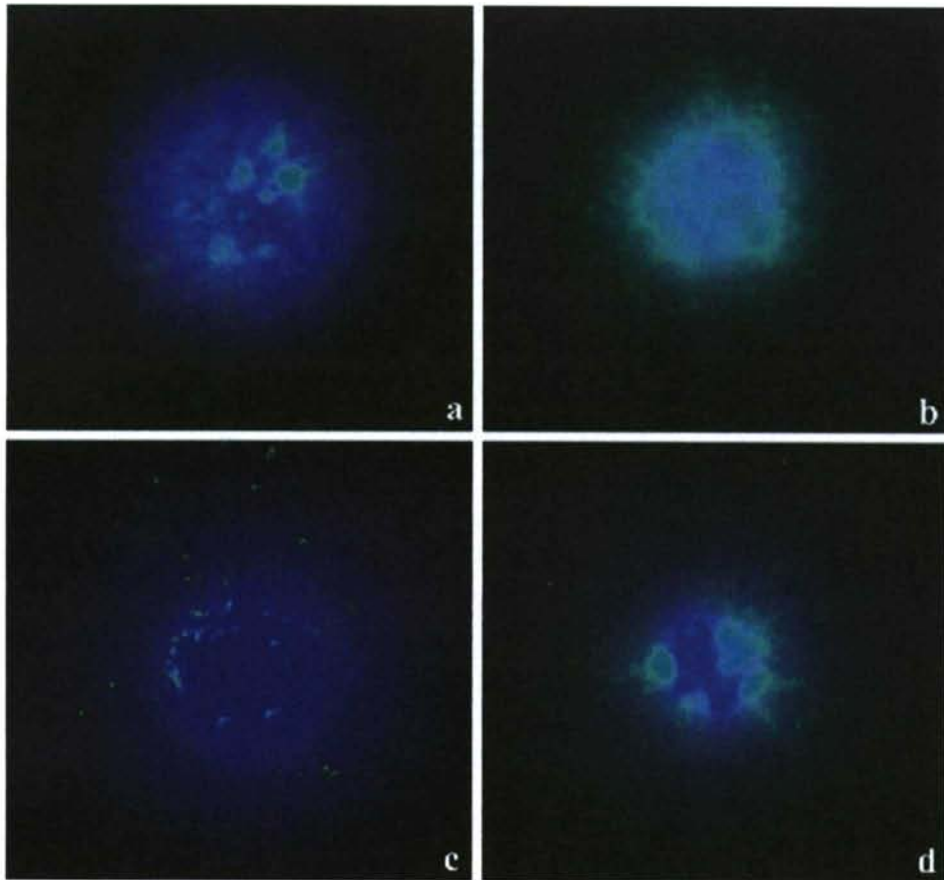
**Tabla 3.** Parámetros de la señal basal de DBD-FISH, obtenidas en leucocitos humanos y en esplenocitos de ratón tras la hibridación con la respectiva sonda para el genoma total, revelada con avidin-FITC (verde). A: unwinding alcalino con NaCl a 7°C. B: unwinding alcalino sin NaCl a 22°C.

		HUMANO*			RATÓN*			RATÓN/ HUMANO
Área ( S ) (número de pixels)	A:	4,04	±	0,95	12,05	±	2,91	2,98
	B:	3,65	±	0,93	12,28	±	1,95	3,36
Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) (nivel de grises medio)	A:	1,32	±	0,46	2,64	±	0,46	2,01
	B:	0,05	±	0,01	0,72	±	0,25	14,91
Intensidad Total de Fluorescencia ( S x MFI )	A:	5061,60	±	1393,04	32274,37	±	10003,71	6,38
	B:	182,35	±	51,64	9085,74	±	3849,15	49,82

\*Estos datos se presentan divididos entre 1000

Además, se puede observar en la figura 9 que la señal basal de DBD-FISH no es homogénea ni en el nucleóide de los leucocitos humanos ni en el de los esplenocitos de ratón, distinguiéndose áreas restringidas con elevado marcaje. En los leucocitos

humanos, la solución alcalina con NaCl a 7°C provoca una desnaturalización bastante restrictiva (Vázquez-Gundín et al., 2000; Fernández et al., 2001b), y permite discriminar mejor las áreas de elevado marcaje en el núcleo. Sin embargo, aunque los esplenocitos de ratón también presentan esa diferencia intragenómica en la señal basal cuando se emplea esta solución desnaturalizante con NaCl, el contraste entre las regiones más sensibles aumentó considerablemente al utilizar una desnaturalización aún más restrictiva (sin NaCl).



**Figura 9.** Señal basal de DBD-FISH (verde-FITC) obtenidas con la sonda para el genoma total en leucocitos humanos (izquierda) y en esplenocitos de ratón (derecha). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). (a) células humanas tratadas con solución de unwinding 0.03 M NaOH, 1M NaCl, 7°C; (b) células de ratón tratadas con el mismo tipo de unwinding; (c) células humanas tratadas con solución de unwinding 0.03 M NaOH, 22°C; (d) células de ratón tratadas con el mismo tipo de solución de unwinding. La señal basal no es homogénea en el núcleo celular. Las células de ratón presentan una señal basal más fuerte que las células humanas. Esta diferencia se aprecia más cuando se emplea la segunda solución de unwinding, menos desnaturalizante.

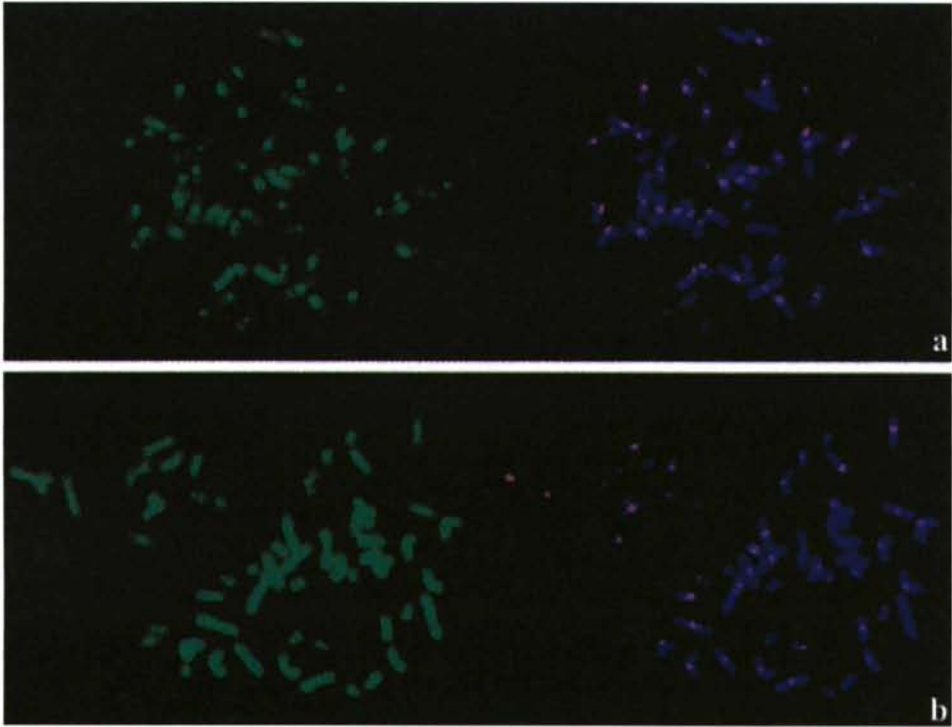


Debido a que en trabajos anteriores, se demostró que la señal basal de DBD-FISH en leucocitos humanos estaba íntimamente relacionada con las secuencias de ADN satélite clásico de 5pb (Fernández et al., 2001b), es posible que la señal basal en los esplenocitos de ratón pudiese estar también relacionada con secuencias de ADN satélite heterocromático. Además, la elevada señal basal que aparece en estos esplenocitos de ratón, en comparación con la señal basal de los leucocitos humanos, indicaba que se trataba de una secuencia muy abundante, en caso de ser una secuencia única. El ADN satélite principal de ratones era un candidato razonable, ya que es una secuencia de ADN satélite heterocromático muy abundante. Si esto fuese cierto, las áreas nucleares con fuerte señal basal en DBD-FISH tras la hibridación con sonda para el genoma total, deberían ser también las áreas que hibriden con la sonda para la secuencia de ADN satélite principal. Para probar esta hipótesis realizamos una cohibridación simultánea de ambas sondas.

Existe la posibilidad de que aunque el ADN de cadena sencilla producido por la desnaturalización en las células de ratón se distribuyera homogéneamente entre las distintas secuencias de ADN, la sonda para el genoma total hibridara preferencialmente en las zonas de ADN de cadena sencilla que correspondieran a las áreas de ADN satélite repetitivo, sesgando los resultados. Para analizar si esto ocurría, se hibridaron cromosomas en metafase procedentes de células L-929, con sonda para el genoma total (revelado con FITC) y con sonda para el satélite principal (marcada con Cy-3), de forma simultánea. Si realizábamos la hibridación y el lavado a 37°C, el perfil de la intensidad de pixels para la sonda del genoma total a través del eje cromatídico indicaba que las regiones heterocromáticas pericentroméricas correspondientes a las áreas del ADN satélite principal, hibridaban  $1,54 \pm 0,11$  veces más sonda que en el resto de los brazos cromosómicos (Fig. 10a). Sin embargo, cuando la hibridación y los lavados se realizaron a temperatura ambiente (22°C), esta diferencia desaparecía casi completamente, disminuyendo a  $1,11 \pm 0,06$  veces (Fig. 10b). Por lo tanto, la incubación a 37°C restringía la hibridación de las secuencias simples (no repetitivas) de ADN procedentes de los brazos del cromosoma, mientras que las secuencias de ADN satélite hibridaban fuertemente debido a su naturaleza repetitiva. Sin embargo, la incubación a temperatura ambiente disminuyó el rigor de la hibridación en los brazos cromosómicos, hibridando más sonda y eliminado casi totalmente la hibridación



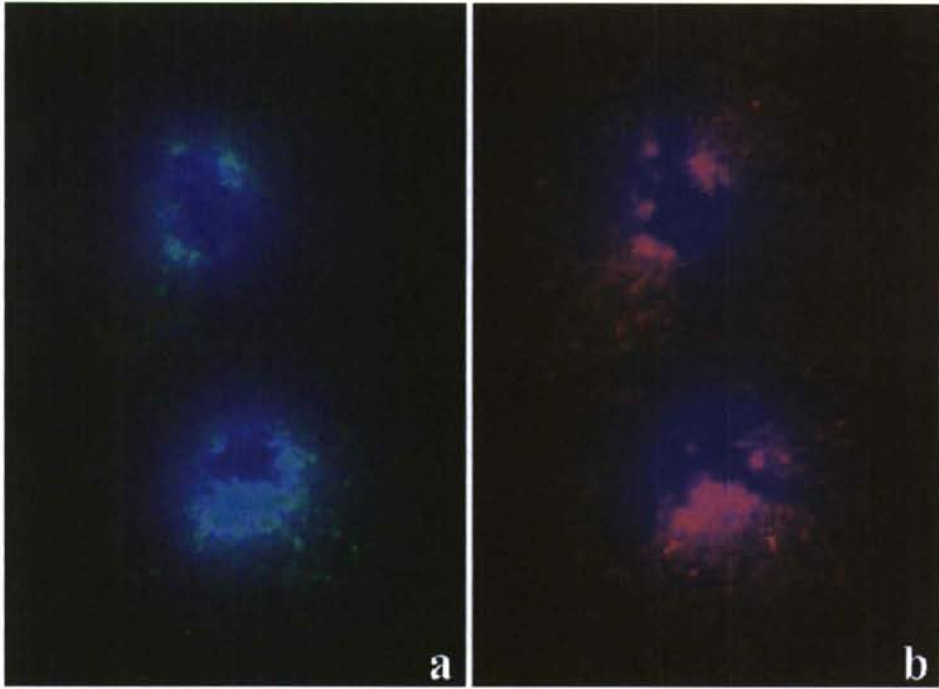
preferencial de las secuencias de ADN repetitivo procedentes de la sonda del genoma total.



**Figura 10.** Mitosis de ratón L-929 hibridadas simultáneamente con sonda para el genoma global (verde) y con sonda para el satélite principal (rojo): (a) a 37°C, (b) o a 22°C. La hibridación a 22°C evita casi completamente la hibridación preferencial de la sonda del genoma global en las áreas del satélite principal, observadas a 37°C. Los cromosomas se contratiñeron con DAPI (azul).

En nuestro protocolo de DBD-FISH, las sondas para el genoma total se hibridan siempre a temperatura ambiente durante 20 horas, evitando casi completamente las hibridaciones preferenciales. Teniendo esto en cuenta, la co-hibridación con sondas para el genoma total y para el ADN satélite principal se realizó a temperatura ambiente, en esplenocitos de ratón, desnaturalizados en una solución alcalina sin NaCl. Como se puede ver en la figura 11a y b, ambas sondas están co-localizadas, demostrando entonces, que la secuencia del ADN satélite principal es la principal responsable de la señal basal en las células de ratón. Esto quiere decir que el satélite principal de ratón es hipersensible a la desnaturalización alcalina, al igual que acontecía con el satélite de 5

pb humano. Posiblemente presenta modificaciones estructurales que favorecen la desnaturalización por el álcali, esto es, contiene lugares lábiles alcalinos constitutivos.



**Figura 11.** Señal basal de DBD-FISH en esplenocitos de ratón hibridados simultáneamente con: (a) sonda para el genoma total (verde), y (b) sonda para el satélite principal (rojo). Las áreas de señal intensa con la sonda de genoma total colocalizan con el satélite principal. Los núcleos se contrañeron con DAPI (azul).

Si comparamos las secuencias del ADN satélite humano de 5 pb y las secuencias del ADN satélite principal de ratón vemos que existe cierto paralelismo entre ellas. Ambas familias proceden de unidades simples repetitivas, que se han amplificado a una unidad mayor, y que contienen algunas secuencias divergentes respecto a la unidad básica. Por ejemplo, la secuencia de ADN satélite de 5 pb específica para el cromosoma humano 9 (locus D9Z3) es una secuencia repetitiva de 158 pb, que consiste en una secuencia de 10 nucleótidos CAACCCGACT, seguida por repeticiones divergentes de 5 nucleótidos GGAAT (Moyzis et al., 1987). Por otro lado, el ADN satélite principal está compuesto de unidades repetitivas de 234 pb, generadas por duplicación de una unidad repetitiva de 117 pb. Cada unidad contiene dos subunidades que son un cuarto de

repetición con una mitad  $\alpha$  y otra mitad  $\beta$ , derivadas de una secuencia de 9 pb (Lewin, 1997). Aunque existen diferentes subfamilias específicas en la secuencia del ADN satélite de 5 pb, el ADN satélite principal de ratón presenta un alto grado de homogeneidad en su secuencia (Vissel y Choo, 1989). Esta homogeneidad es posiblemente debido a una elevada frecuencia de intercambio entre cromosomas no homólogos, facilitada por la naturaleza telocéntrica de los cromosomas de ratón (Kipling et al., 1991). Ambos satélites, el humano de 5 pb y el principal de ratón, se localizan en zonas pericentroméricas, adyacentes a las secuencias satélites alfoides en humanos, o al satélite menor en ratón (Tyler-Smith y Willard, 1993). Los bloques de cromatina que contienen tanto los satélites de 5pb como el satélite principal, aparecen teñidos intensamente con DAPI o con Distamicina A / DAPI y se pueden descondensar mediante tratamiento con Hoechst 33258 (Sumner, 1990; Verma y Babu, 1995). Mientras que los satélites humano alfoide o el satélite menor de ratón tienen un papel clave en la función centromérica, asegurando la segregación cromosómica correcta, los satélites de 5 pb y el principal no tienen una función tan clara.

Finalmente, queda de nuevo demostrada la elevada abundancia de lugares lábiles alcalinos constitutivos en ambos satélites y su notable similitud. La naturaleza de estos lugares lábiles alcalinos no está clara, pueden ser roturas enmascaradas, lugares abásicos, apurínicos o apirimidínicos (AP) o daño en desoxirribosas. Estos lugares lábiles alcalinos constitutivos se transforman en roturas de cadena de ADN por el tratamiento con el álcali. Las desoxirribosas alteradas, podrían ser más típicas de daño por radicales, por ejemplo, después de exposición a radiaciones ionizantes (von Sonntag, 1987). La formación de lugares AP en células normales vivas es un fenómeno bien conocido, especialmente los lugares AP originados por la pérdida de bases púricas producidos por la rotura espontánea del enlace entre el azúcar y la base púrica. Además, el metabolismo normal del oxígeno puede generar especies reactivas de oxígeno, que pueden atacar anillos púricos o pirimidínicos. De este modo, utilizando una sonda reactiva al aldehído, se estimó la generación de una tasa de 9000 lugares AP por célula/día, en condiciones fisiológicas (Nakamura et al., 1998), siendo esta cantidad dependiente de la edad (Atamna et al., 2000). Los lugares AP se reparan gracias a la acción de las endonucleasas AP, mediante el proceso de reparación por escisión de bases, aunque en *Escherichia coli* la reparación por recombinación también juega un papel importante (Otterlei et al., 2000). Como consecuencia de un desequilibrio entre la



escisión de bases y la reparación, pueden aparecer mutaciones por sustitución de bases, ya que la ADN polimerasa puede copiar sobre los lugares AP (Schaaper et al., 1982; Kunkel, 1984). Además, se ha demostrado que los lugares AP espontáneos no reparados pueden desencadenar la escisión por la topoisomerasa II, induciendo puntos de ruptura cromosómicos, como los próximos al lugar 11q23, que están relacionados con la leucemia humana (Kingma et al., 1997).

En nuestro caso, hemos encontrado que los lugares lábiles alcalinos, tanto en las células de ratón como en las humanas, no están homogéneamente distribuidos en el genoma. La mayoría de ellos se concentran en áreas de secuencias de ADN específicas, por ejemplo, los satélites de 5 pb en humanos y el satélite principal en ratones. Esta especificidad sugiere que esta presencia de abundantes lugares alcalinos en determinadas secuencias no es resultado de un daño espontáneo, sino que es constitutivo de estas secuencias de ADN satélite. Esto podría ser tolerado por las células ya que los lugares lábiles alcalinos están presentes en regiones de heterocromatina no codificantes. Sin embargo, la reparación de los lugares AP debería tener lugar antes de la replicación del ADN, en la fase S tardía, para evitar las aberraciones cromosómicas. De hecho, los satélites humanos de 5 pb y el satélite principal de ratón están implicados en la formación de fusiones Robertsonianas entre cromosomas acrocéntricos y telocéntricos (Vissel y Choo, 1989; Gravholt et al., 1992). La elevada concentración de lugares lábiles alcalinos en ambas secuencias puede promover una especial fragilidad en esta cromatina específica.

Los lugares lábiles alcalinos constitutivos se han descrito en el genoma total de espermatozoides de humanos y de ratones, en eritrocitos de pollo y en el ADN de riñón de ratón (Singh et al., 1989; Fairbairn et al., 1994), y pueden estar relacionados con el elevado empaquetamiento de la cromatina característico de estas células. En consecuencia, la abundancia de lugares lábiles alcalinos en los satélites humanos de 5 pb y en el satélite principal de ratón está probablemente relacionada con la estructura de la cromatina, altamente compactada en estas áreas heterocromáticas. Así, aunque las secuencias son diferentes, la organización espacial de la cromatina podría ser similar tanto en el área del satélite principal como en el área del satélite de 5 pb, constituyendo una estructura que promueve la estructuración adecuada de centrómeros y su activación en fibras de cromatina adyacentes que contienen las secuencias de ADN alfoide o del



satélite menor. Recientemente, resultados en simulaciones de dinámica molecular indican que los lugares AP perturban la estructura del ADN, induciendo una flexibilidad adicional, con aumento del movimiento de las bases y del esqueleto azúcar-fosfato cerca de los lugares AP (Barsky et al., 2000). Esto podría aportar un papel estructural a los lugares lábiles alcalinos constitutivos en secuencias de ADN satélite específicas, en relación con el elevado nivel de empaquetamiento de la cromatina. Estudios mas recientes en espermatozoides humanos (Muriel et al., 2004) y en las secuencias repetitivas teloméricas intersticiales (ITRS) de hámster chino (Rivero et al., 2004) parecen apuntar a otra posible naturaleza de los lugares lábiles alcalinos, ya que en ambos se ha observado una elevada sensibilidad a la digestión “in situ” con la nucleasa mung bean, indicando que pueden estar enriquecidos en pequeños segmentos de ADN sin emparejar. La elevada frecuencia de estos segmentos de ADN sin emparejar podría resultar en una estructura de la cromatina particular, permitiendo la constitución de áreas del genoma altamente compactadas. Esto se desarrollará con más detalle en el trabajo sobre los ITRS presentado más adelante.

En relación con estudios de mutagénesis mediante DBD-FISH, empleando sonda para el genoma total, debemos destacar que la elevada señal basal en las áreas de ADN satélite principal implica una baja sensibilidad en la detección de niveles bajos de roturas inducidas. Esto podría ocurrir en todas las técnicas que incluyen el paso de desnaturalización alcalina. Este problema se podría solventar empleando condiciones desnaturalizantes muy restrictivas y/o suprimiendo la señal del satélite principal, mediante la hibridación con sonda para el genoma total bloqueada con exceso de ADN satélite principal de ratón, previa a la incubación en el portaobjetos. Si analizamos el efecto de las roturas del ADN inducidas específicamente en las áreas del ADN satélite principal, se podría esperar un incremento con respecto a la señal basal solamente en un rango de dosis alto comparado con el resto del genoma de ratón. Además, debería lograrse la saturación de la producción de ADN de cadena sencilla, desnaturalizado, con dosis más bajas que sobre las regiones con señal basal más baja. Finalmente, de la misma forma que sucede en las células humanas, la existencia de señales basales diferentes en secuencias de ADN distintas, da lugar a que para la comparación de sensibilidades entre diferentes secuencias de ADN, en estudios de dosis-respuesta, solamente se puedan emplear los valores relativos del incremento con respecto a cada señal basal específica.

***“High frequency of constitutive  
alkali-labile sites in mouse major  
satellite DNA, detected by DNA  
Breakage Detection-Fluorescence  
In Situ Hybridization”***

## High frequency of constitutive alkali-labile sites in mouse major satellite DNA, detected by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization

M.T. Rivero<sup>a</sup>, F. Vázquez-Gundín<sup>a</sup>, V. Goyanes<sup>b</sup>, A. Campos<sup>b</sup>,  
M. Blasco<sup>c</sup>, J. Gosálvez<sup>d</sup>, J.L. Fernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, Avda de Montserrat s/n, 15009 La Coruña, Spain

<sup>b</sup> Sección de Genética, Hospital "Teresa Herrera", Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad de La Coruña, La Coruña, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Campus Cantoblanco, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Unidad de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Received 9 April 2001; received in revised form 28 May 2001; accepted 1 June 2001

### Abstract

DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH) is a new procedure for detecting and quantifying DNA breaks and alkali-labile sites in single cells. Cells trapped within an agarose matrix are deproteinized and treated with an alkaline unwinding solution that transforms DNA breaks and alkali-labile sites into single-strand DNA (ssDNA) motifs starting from the end of the break. These ssDNA motifs are susceptible to being hybridized with whole genome or specific DNA probes, and detected using current FISH procedures. As DNA breaks increase in a target region, more ssDNA is produced and more DNA probe hybridizes, thus increasing the FISH signal, which may be captured and analyzed using a digital image analysis system. This increase can be reflected in the surface area, mean and whole fluorescence intensity of the signal. When intact mouse splenocytes were processed with this technique using a whole genome probe, a very strong background signal was evident when compared with human blood leukocytes. In fact, when using 0.03 M NaOH as the alkaline unwinding solution at 22°C for 2.5 min, the whole fluorescence intensity from mice cells was 50 times higher than that from human cells, thus suggesting the existence of a high frequency of constitutive alkali-labile sites in the DNA from mouse cells. Furthermore, when alkaline unwound mouse cells were simultaneously hybridized with the whole genome probe (FITC-revealed, green) and a major satellite DNA probe (Cy-3-labeled, red) both signals appeared co-localized. This result demonstrates that the high frequency of constitutive alkali-labile sites detected in the mouse genome is mainly located in the major satellite DNA sequences, resembling the findings from human 5 bp classical satellite DNA sequences. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH); Alkali-labile sites; DNA breaks; Satellite DNA; Major satellite

### 1. Introduction

DBD-FISH (DNA breakage detection FISH, Fernández et al. [1] and Fernández and Gosálvez [2]) allows in situ detection and quantification of DNA breaks and alkali-labile sites in the whole genome or within specific DNA sequences, cell by cell. Isolated

\* Corresponding author. Tel.: +34-981-287499;

fax: +34-981-287122.

E-mail address: genetica@cog.es (J.L. Fernández).



cells immersed in an agarose microgel, are exposed to an alkaline unwinding solution, deproteinized and dehydrated. The alkali transforms DNA breaks and alkali-labile sites into ssDNA areas which may be hybridized with whole genome or specific DNA probes. As DNA breaks increase in a target region, more ssDNA is produced and more specific probe hybridizes, resulting in a more intense FISH signal, that is quantified with an image analysis system. Conditions of unwinding may be adapted to produce different lengths of ssDNA starting from the ends of a DNA break [3,4]. Furthermore, the order of incubation in unwinding and deproteinizing solutions can be changed [5] when it is desirable to improve the accessibility of the alkali to the target DNA.

Besides induced DNA strand breaks and alkali-labile sites, the DBD-FISH procedure has been useful in certain structural analysis of native chromatin. Thus, the whole DNA from mature human sperm cells has been found to be arranged with a large number of constitutive alkali-labile sites [5,6]. The same phenomenon has been demonstrated in human somatic cells (i.e. blood leukocytes), but specifically within the 5 bp classical satellite DNA sequences [7]. In this report, we describe the background DBD-FISH signal in the whole genome of mouse cells, showing a very intense labeling, demonstrating that this is the consequence of a great abundance of constitutive alkali-labile sites specifically in the major satellite DNA sequences.

## 2. Materials and methods

### 2.1. FISH in mitoses

Mouse L929 cells, a subline from the classical L-line established by W.R. Earle in 1940 from areolar and adipose subcutaneous tissue from a male mouse, were grown in monolayer at 37°C in RPMI medium supplemented with 15% fetal calf serum, antibiotics and L-glutamine. Cells were arrested at metaphase by a 3 h treatment with 0.5 µg/ml colchicine, hypotonically treated with 0.075 M KCl, fixed three times in methanol:acetic acid (3:1), spread onto glass slides and air-dried.

Slides were denatured in 70% formamide/2 × SSC, pH 7, at 70°C for 2 min and dehydrated in increas-

ing ethanol series. A commercially available major mouse satellite DNA probe-Cy3-labeled (Cambio) was complemented with a mouse whole genome probe, biotin-labeled by nick-translation (4.3 µg/ml). The mixed probes were denatured for 8 min at 70°C and hybridized overnight onto denatured slides, either at 37°C or at room temperature (22°C). Slides were washed twice in 50% formamide/2 × SSC, pH 7, 5 min and twice in 2 × SSC, pH 7, 3 min. Those hybridized at 37°C were also washed at this same temperature, whereas those hybridized at 22°C were washed at room temperature. Whole genome probe was detected by a 30 min incubation with FITC-labeled avidin (1:400), and slides were finally counterstained with DAPI (1 µg/ml) in Vectashield (Vector).

Digital images were acquired with an Ultratrax 1600 camera (Astrocam) and corrected for current dark image and non-uniform illumination. The average signal intensity of the whole genome probe in pericentromeric regions and in chromosome arms was established in 10 chromosomes of 10 mitoses from slides either hybridized at 37°C or at room temperature. To this end, a profile of the pixel intensity was determined through a current line selection along the chromatid axis, using the plot view function of the camera.

### 2.2. DBD-FISH

The mice used in the study were the wild-type described by Zhu et al. [8]. All mice were housed in our barrier area in Madrid, where pathogen-free procedures are employed in all mouse rooms. Quarterly health monitoring reports have been negative for all pathogens in accordance with FELASA recommendations (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Single cell suspensions in RPMI medium were prepared from the spleen by mechanical disaggregation. Splenocytes were collected in a 1.5 ml Eppendorf tube. After 5 min sedimentation, the supernatant was transferred to another tube. After centrifugation at 1000 × g for 5 min, the cell pellet was resuspended in RPMI medium. Heparinized venous blood was obtained from a healthy, 37-year-old non-smoker male, who had not been exposed to genotoxic agents. Written informed consent was obtained. After 30 min sedimentation at room temperature, 1 ml of buffy coat containing blood leukocytes was transferred to an Eppendorf tube. After centrifugation at



1000 × g for 5 min, the cell pellet was resuspended in 1 ml of RPMI medium.

Mouse splenocytes or human blood leukocytes, in RPMI 1640 medium, were separately mixed with low melting point agarose at 37°C, achieving a final concentration of 0.7%. 15 µl of the mixture were deposited onto a glass slide precoated with 0.65% standard agarose dried at 80°C, covered with a coverslip (10 mm × 60 mm) and allowed to solidify at 4°C. Half the length of the slide was covered with mouse splenocytes and the other half with human leukocytes, so that both cell types could be simultaneously processed on the same slide. Coverslips were gently removed and the slides were placed in lysing solution (0.4 M Tris-HCl, 2 M NaCl, 1% SDS, pH 7.5) at room temperature for 20 min. After protein removal, the resultant nucleoids were washed in abundant 0.9% NaCl for 10 min and then incubated in the alkaline unwinding solution for 2.5 min. Some slides were immersed in 0.03 M NaOH, 1 M NaCl, pH 12.2 at 7°C, whereas others were placed in 0.03 M NaOH, without NaCl, at 22°C. The alkaline unwinding solution without the NaCl is much less denaturant than that with NaCl [3]. After neutralizing with 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 min, nucleoids were washed in TBE buffer for 2 min, dehydrated by sequential 70, 90 and 100% ethanol baths, 2 min each, and air-dried.

Slides prepared using both unwinding conditions were hybridized overnight, at room temperature, with a denatured whole genome (either human or mouse) biotin-labeled probe. In other experiments, mouse splenocytes were hybridized at room temperature with a mixture of a major satellite DNA probe-Cy3-labeled and the whole genome biotin-labeled probe. Slides were washed in 50% formamide/2 × SSC, pH 7, 5 min, and twice in 2 × SSC, pH 7, 3 min, at room temperature. Whole genome probe was detected with FITC-labeled avidin (1:400), and nucleoids were counterstained with DAPI (2 µg/ml) in Vectashield.

Fluorescent signals were viewed under a DMRB epifluorescence microscope (Leica) equipped with a DMRD photoexposer, using a PL Fluotar 100× objective and appropriate fluorescence filters. Nuclei were located under the DAPI filter (blue fluorescence). FITC-green signal from hybridized whole genome probe in each nucleus was acquired in black and white using a high sensitivity CCD camera (Ultramax 1600, Astromcam), which distinguishes over 16,000 grey

levels and allows subtraction of the current dark image, i.e. electronic noise, and correction for non-uniform sample illumination. Groups of 50 digital images, each corresponding to a nucleus, were taken for each experimental point under similar conditions, stored in the file format of the camera (.apf) and then converted to .img files. Each experiment was repeated at least twice. Image analysis was performed using a macro designed with Visilog 5.1 software (Noesis). This allows for thresholding, background subtraction, and measures the surface area (number of pixels), mean fluorescence intensity (MFI) (mean grey level), and whole fluorescence intensity (area × mean fluorescence intensity: sum of the grey level from all pixels) of the signals.

In case of co-hybridization of major satellite DNA and whole genome probes, images from different fluorochromes were merged using Adobe Photoshop 6.0 software.

### 3. Results and discussion

The background DBD-FISH signal in the whole genome of mouse and human cells is presented in Fig. 1 and Table 1. Using very restricted denaturing conditions (i.e. the alkaline unwinding solution without NaCl at 22°C) does not modify the surface of the signal (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ) in either cell type compared with that obtained with the alkaline unwinding solution with NaCl at 7°C. Nevertheless, the former denaturing condition decreased the mean and whole fluorescence intensity approximately 27-fold in the case of human blood leukocytes. In the case of mouse splenocytes, this decrease was only 3.6-fold. Though both cell types have more or less the same genome size, about 6.000 Mb per diploid nucleus [9], mouse cells yielded a background DBD-FISH signal three times more widespread than that of human cells, with both unwinding protocols. Moreover, the difference in mean fluorescence intensity between mouse and human cells increased from 2 to 15 times (7 times greater) when using the very highly restricted unwinding condition. Thus, the difference in the whole fluorescence intensity increased from 6 to 50 times when using the weaker denaturing condition. Both cell types were simultaneously processed on the same slide,

Table 1

Parameters of the background DBD-FISH signal, FITC-labeling (green), obtained in human blood leukocytes and mouse splenocytes after hybridization with the respective whole genome probe<sup>a</sup>

		Human <sup>b</sup>	Mouse <sup>b</sup>	Mouse/human
Surface area ( <i>S</i> ) (number of pixels)	A	4.04 ± 0.95	12.05 ± 2.91	2.98
	B	3.65 ± 0.93	12.28 ± 1.95	3.36
MFI (mean grey level)	A	1.32 ± 0.46	2.64 ± 0.46	2.01
	B	0.05 ± 0.01	0.72 ± 0.25	14.91
Whole fluorescence intensity ( <i>S</i> × MFI)	A	5061.60 ± 1393.04	32274.37 ± 10003.71	6.38
	B	182.35 ± 51.64	9085.74 ± 3849.15	49.82

<sup>a</sup> (A): alkaline unwinding with NaCl at 7°C; (B): alkaline unwinding without NaCl at 22°C.

<sup>b</sup> Data presented are divided by 1000.

thus avoiding possible interexperimental or interslide variation.

The background DBD-FISH signal does not appear to be homogeneous within the nucleoid, either in human or mouse cells (Fig. 1). Thus, several areas with greater labeling can be distinguished. In the case of human cells, unwinding with NaCl at 7°C is a very restricted denaturing condition compared with the same unwinding solution at 22°C [4,7]. This condition allows to discriminate areas of greater labeling within the whole nucleus. Nevertheless, although mouse cells also exhibit this intragenomic difference in background labeling with alkaline unwinding with NaCl at 7°C, the contrast is considerably increased when using an even more restricted unwinding, i.e. without NaCl. In a previous report, the background DBD-FISH signal in human blood leukocytes was demonstrated to be mainly dependent on the heterochromatic 5 bp classical satellite DNA sequences [7]. Thus, the background labeling in mouse cells was thought to be related also to a heterochromatic satellite DNA sequence family. Furthermore, their much stronger labeling compared with human cells pointed to a very abundant sequence. Mouse major satellite DNA is a reasonable candidate since it is a highly abundant heterochromatic satellite DNA sequence. If this is true, the nuclear areas with strong background DBD-FISH signal after hybridization with the mouse

whole genome probe should also be a target for hybridization for a major satellite DNA probe. Thus, a simultaneous co-hybridization experiment with both probes is the test of choice for this hypothesis.

Nevertheless, the possibility exists that although the ssDNA generated by the unwinding in mouse cells could be approximately homogeneously distributed among the different DNA sequences, the whole genome probe preferentially hybridized in that ssDNA corresponding to repetitive satellite DNA areas, thus biasing the results. This possibility was assayed by hybridizing metaphase chromosomes from mouse L-929 cells simultaneously with the whole genome FITC-revealed probe and the major satellite Cy3-labeled probe. If hybridized and washed at 37°C, the profile of the pixel intensity of the whole genome probe through the chromatid axis indicated that the pericentromeric heterochromatic regions, corresponding to major satellite DNA sequence areas, hybridized 1.54 ± 0.11 times as much probe than the rest of the chromosome arms (Fig. 2a). Nevertheless, when the hybridization and washings were performed at room temperature (22°C), this difference almost completely disappeared, decreasing to 1.11 ± 0.06 times (Fig. 2b). Incubation at 37°C restricted the hybridization of single DNA sequences from chromosome arms whereas satellite DNA sequences hybridized strongly due to their repetitive nature. Hybridization at room

Fig. 1. Background DBD-FISH signal (FITC-green) obtained with a whole genome probe in human leukocytes (left) and mouse splenocytes (right). Nuclei were DAPI-counterstained (blue). (a) Human cell unwound with 0.03 M NaOH, 1 M NaCl, 7°C; (b) mouse cell unwound with this same solution; (c) human cell unwound with 0.03 M NaOH, 22°C; (d) mouse cell unwound with this same solution. Background signal is not homogeneous within the cell nucleus. Mouse cells show a stronger background than human cells, this difference being more remarkable when using the second less denaturant alkaline solution.

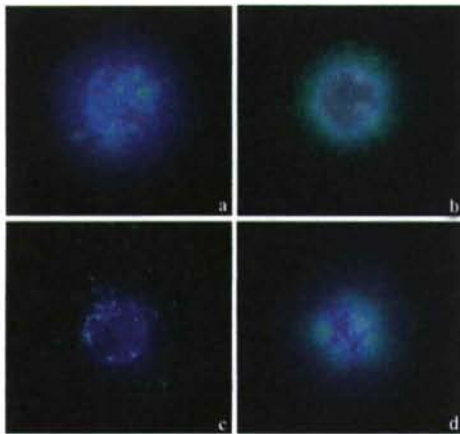


Fig. 1.

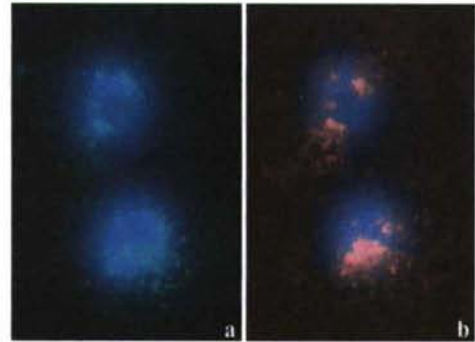


Fig. 3. Background DBD-FISH signal in mouse splenocytes simultaneously hybridized with: (a) a whole genome probe (green), and (b) a major satellite DNA probe (red). Both signals co-localize. Nuclei were DAPI-counterstained (blue).

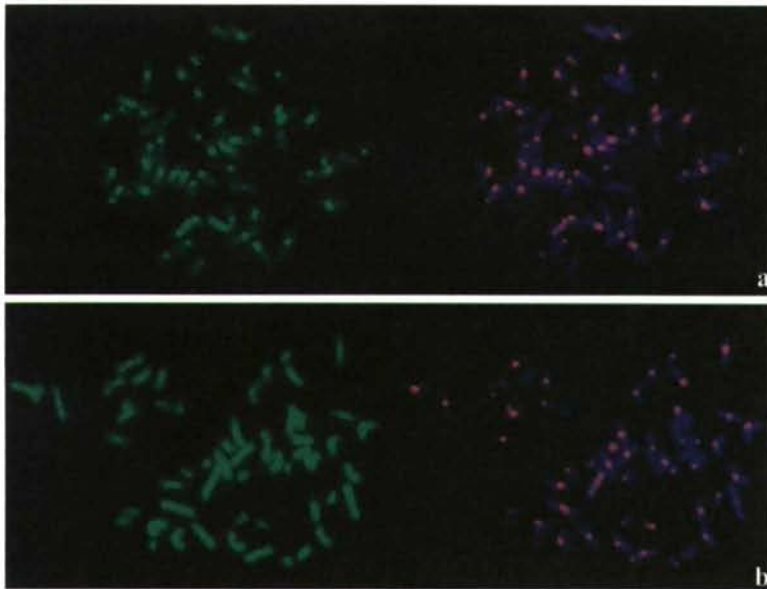


Fig. 2. Mouse L-929 mitoses simultaneously hybridized with a whole genome probe (green) and a major satellite DNA probe (red): (a) at 37°C, (b) or at 22°C. Hybridization at 22°C almost completely avoids the preferential hybridization of the whole genome probe in major satellite DNA areas, observed at 37°C. Chromosomes were DAPI-counterstained (blue).



temperature relaxed the stringency of hybridization in chromosome arms, hybridizing more probe, then almost totally eliminating the preferential hybridization of the repetitive satellite DNA sequences from the whole genome probe.

In our DBD-FISH protocol, whole genome probes are always hybridized at room temperature for 20 h, thus almost completely avoiding preferential hybridizations. Taking this into account, co-hybridization of whole genome and major satellite DNA probes was performed at room temperature, on mouse splenocytes denatured in alkaline unwinding solutions without NaCl. As shown in Fig. 3a and b, both probes co-localize, demonstrating that major satellite DNA sequences are mainly responsible for the entire background DBD-FISH signal in mouse cells.

The parallelism between human classical 5 bp satellite DNA sequences and mouse major satellite DNA sequences are remarkable. Both families are derived from repetitive simple units, with the subsequent amplification of a unit larger than the basic motif that contains some diverged sequences. For example, the specific 5 bp satellite DNA sequences of human chromosome 9 (D9Z3 locus) is a repeated sequence of 158 bp that consists of the 10 nucleotide sequence CAACCCGAGT followed by diverged 5 nucleotide GGAAT repeats [10]. Otherwise, the major satellite DNA is composed of repeating units of 234 bp, generated by duplication of a 117 bp repeating unit. Each contains two further subunits. Each of them is a quarter-repeat containing an  $\alpha$  and  $\beta$  half, derived from a 9 bp sequence [11]. Although different specific subfamilies of human 5 bp satellite DNA sequence exist, mouse major satellite DNA exhibits a high degree of sequence homogeneity [12]. This homogenization is possibly due to a high frequency of exchange between non-homologous chromosomes facilitated by the telocentric nature of mouse chromosomes [13]. Both human 5 bp and mouse major satellites localize pericentromeric, adjacent to human alphoid or the equivalent mouse minor satellite DNA sequences [14]. Chromatin blocks containing either 5 bp or major satellites appear intensely stained with DAPI or Distamycin/DAPI and may be undercondensed by treatment with Hoechst [15,16], unlike the human alphoid or mouse minor satellites. Whereas these latter satellites have a key role in

centromeric function ensuring proper chromosome segregation, 5 bp and major satellites do not have such a clear role. Finally, the great abundance of constitutive alkali-labile sites in both satellites is a newly demonstrated and remarkable similarity. These are DNA modifications that are transformed into DNA strand breaks by alkali treatment. Chemically, they correspond to abasic sites, apurinic or apyrimidinic (AP), or altered deoxyriboses [17], although the latter could be more typical of radical damage, e.g. after ionizing radiation. AP sites, specially, purine bases lost by spontaneous fission of the base-sugar link, is a well known phenomenon in normal living cells. Moreover, normal oxygen metabolism can generate reactive oxygen species that may attack purine and pyrimidine rings. Thus, using a novel aldehyde reactive probe, a rate of 9000-AP sites per cell per day under physiological conditions has been estimated [18], the amount being age-dependent [19]. AP sites are repaired by AP endonucleases during the process of base excision repair, though recombination and translesion DNA synthesis also play a role, in *Escherichia coli* [20]. As a consequence of an imbalance in base excision/AP endonuclease repair, base-substitution mutations may arise, since DNA polymerase can copy over AP sites [21,22]. Furthermore, it has been reported that unrepaired spontaneous AP sites may trigger the topoisomerase II cleavage, inducing chromosomal breakpoints, like those proximal to the human leukemic 11q23 site [23].

In our case, we found that alkali-labile sites, in human and mouse cells, as reported here, are not homogeneously distributed within the genome, most of them being concentrated in specific DNA sequence areas, i.e. 5 bp satellites in human and major satellite in mouse. This specificity suggests that they are not the result of spontaneous damage, being constitutive of these satellite DNA sequences. They should be tolerated by the cells since they are present in heterochromatic non-coding regions. Nevertheless, repair of AP sites should take place before their DNA replication in late S-phase, to avoid chromosomal aberrations. In fact, both human 5 bp satellites and mouse major satellite were involved in the constitution of Robertsonian fusions between acrocentric or telocentric chromosomes [12,24]. The high concentration of alkali-labile sites in both sequences could promote a



special fragility in this specific chromatin. Constitutive alkali-labile sites have been described in the whole genome of human and mouse sperm, chicken erythrocytes and mouse kidney DNA [6,25], and might be related to the characteristic tight packing of chromatin in these cells. The abundance of alkali-labile sites in human 5 bp and mouse major satellites is probably related to the constitution of a specific highly compacted chromatin structure in these heterochromatic areas. Thus, though sequences are different, the spatial organization of chromatin could be similar in both 5 bp and major satellite areas, constituting an underlying structure that promotes adequate centromere assembly and activation [26] in adjacent chromatin fibers containing alphoid or minor satellite DNA sequences. Recently, results of molecular dynamic simulations have indicated that the AP sites perturb canonical DNA structure, inducing an additional flexibility, with increasing motion of the bases and backbone near the AP site [27]. This could favor such a structural role for constitutive alkali-labile sites in specific satellite DNA sequences for promoting tight chromatin packing.

In relation to mutagenesis studies with DBD-FISH using a whole genome probe, the high background signal in major satellite DNA areas implies a low sensitivity to the detection of low levels of induced DNA breaks. This should be the case with all the techniques that include an alkaline incubation step. This problem could be overcome using very restrictive unwinding conditions and/or by suppressing the signal from the major satellite hybridizing the whole genome probe with excess of mouse major satellite DNA prior to incubation in the slide, thus focusing on the rest of the genome. If analyzing the effect of the DNA breakage induced specifically on major satellite DNA areas, an increase with respect to background signal would be expected only in the high dose-range compared with the rest of the mouse genome. Furthermore, a saturation of the unwound ssDNA should be achieved at lower doses than on regions with a lower background signal. Finally, as well as in human cells, the existence of different background signals in the different DNA sequences implies that only relative values of increase with respect to each specific background signal could be used for comparison of the sensitivities among the different DNA sequences in dose-response studies.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the European Atomic Energy Community (Fifth Framework Program, FIGH-CT1999-00009, TELORAD) and for the Consejo de Seguridad Nuclear (Spain). We thank Dr. Phil Mason for improving the English style of the manuscript.

## References

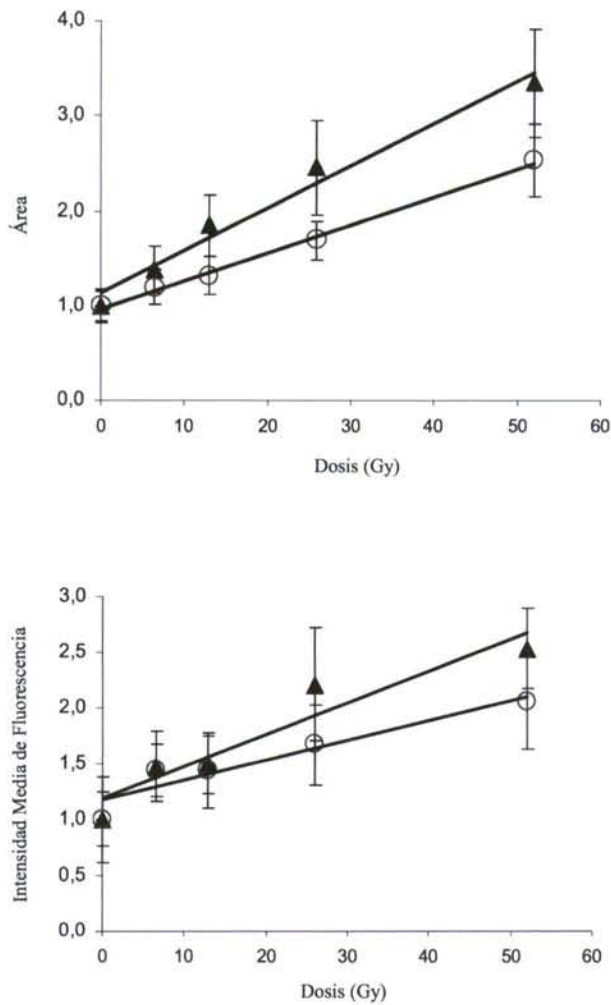
- [1] J.L. Fernández, V.J. Goyanes, J. Ramiro-Díaz, J. Gosálvez, Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage, *Cytogenet. Cell Genet.* 82 (1998) 251–256.
- [2] J.L. Fernández, J. Gosálvez, Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH), in: V. Didenko (Ed.), *In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, in press.
- [3] B. Rydberg, The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells, *Radiat. Res.* 61 (1975) 274–287.
- [4] F. Vázquez-Gundín, J. Gosálvez, J. de la Torre, J.L. Fernández, DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH): effect of unwinding time, *Mutat. Res.* 453 (2000) 83–88.
- [5] J.L. Fernández, F. Vázquez-Gundín, A. Delgado, V.J. Goyanes, J. Ramiro-Díaz, J. de la Torre, J. Gosálvez, DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features, *Mutat. Res.* 453 (2000) 77–82.
- [6] N.P. Singh, D.B. Danner, R.R. Tice, M.T. McCoy, G.D. Collins, E.L. Schneider, Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm, *Exp. Cell Res.* 184 (1989) 461–470.
- [7] J.L. Fernández, F. Vázquez-Gundín, M.T. Rivero, V. Goyanes, J. Gosálvez, Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH, *Mutat. Res.* 473 (2001) 163–168.
- [8] C.M. Zhu, M.A. Bogue, D.S. Lim, P. Hasty, D.B. Roth, Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates, *Cell* 86 (1996) 379–389.
- [9] T. Strachan, A.P. Read, *Human Molecular Genetics* 2, BIOS Scientific Publishers Ltd., 1999.
- [10] R.K. Moyzis, K.L. Albright, M.F. Bartholdi, L.S. Cram, L.L. Deaven, C.E. Hildebrand, E.N. Joste, J.L. Longmire, J. Meyne, T. Schwarzscher-Robinson, Human chromosome-specific repetitive DNA sequences: novel markers for genetic analysis, *Chromosoma* 95 (1987) 375–386.
- [11] B. Lewin, *Genes* VI, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [12] B. Vissel, K.H. Choo, Mouse major (γ) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between non-homologous chromosomes, *Genomics* 5 (1989) 407–414.
- [13] D. Kipling, H.E. Ackford, B.A. Taylor, H.J. Cooke, Mouse minor satellite DNA genetically maps to the centromere and

- is physically linked to the proximal telomere, *Genomics* 11 (1991) 235–241.
- [14] C. Tyler-Smith, H.F. Willard, Mammalian chromosome structure, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3 (1993) 390–397.
- [15] R.S. Verma, A. Babu, *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, 2nd Edition, McGraw-Hill, New York, 1995.
- [16] A.T. Sumner, *Chromosome banding*, Unwin Hyman, London, 1990.
- [17] C. von Sonntag, *The chemical basis of radiation biology*, Taylor & Francis, London, 1987.
- [18] J. Nakamura, V.E. Walker, P.B. Upton, S.Y. Chiang, Y.W. Kow, J.A. Swenberg, Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions, *Cancer Res.* 58 (1998) 222–225.
- [19] H. Atamna, I. Cheung, B.N. Ames, A method for detecting abasic sites in living cells: age dependent changes in base excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 686–691.
- [20] M. Otterlei, B. Kavli, R. Standal, C. Skjeldred, S. Bharati, H.E. Krokan, Repair of chromosomal abasic sites in vivo involves at least three different repair pathways, *EMBO J.* 19 (2000) 5542–5551.
- [21] R.M. Schaaper, T.A. Kunkel, L.A. Loeb, Depurination of DNA as a possible mutagenic pathway for cells, *Basic Life Sci.* 20 (1982) 199–211.
- [22] T.A. Kunkel, Mutational specificity of depurination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984) 1494–1498.
- [23] P.S. Kingma, C.A. Greider, N. Osheroff, Spontaneous DNA lesions poison human topoisomerase II  $\alpha$  and stimulate cleavage proximal to leukemic 11q23 breakpoints, *Biochemistry* 36 (1997) 5934–5935.
- [24] C.H. Gravholt, U. Friedrich, M. Caprani, A.L. Jørgensen, Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* 14 (1992) 924–930.
- [25] D.W. Fairbairn, W.A. Reyes, K.L. O'Neill, Alkali-labile sites are prevalent in kidney tissue DNA, *Cancer Lett.* 81 (1994) 67–76.
- [26] L. Clarke, Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1998) 212–218.
- [27] D. Barsky, N. Foloppe, S. Ahmadi, D.M. Wilson III, A.D. MacKerell Jr., New insights into the structure of abasic DNA from molecular dynamics simulations, *Nucl. Acids Res.* 28 (2000) 2613–2626.

***2. Evaluación de las roturas de  
cadena sencilla y doble en el ADN  
mediante DBD-FISH***

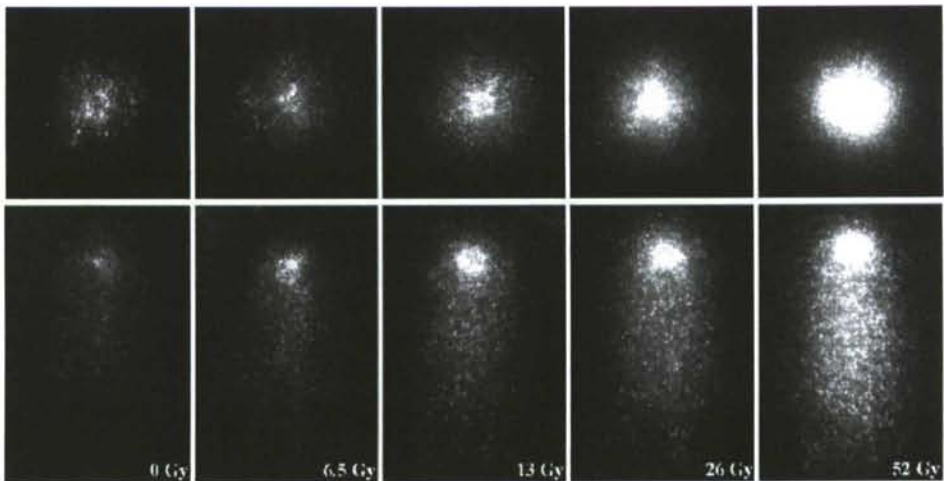
En este estudio, intentamos discriminar al mismo tiempo y en la misma célula tanto las roturas de cadena sencilla como doble. Se realizó el protocolo descrito en Material y Métodos (Tabla 2), tanto en nucleoides, siguiendo el procedimiento habitual de DBD-FISH, como en cometas neutros, intercalando un paso de electroforesis neutra entre la lisis y la desnaturalización. En la figura 12, se representan las curvas dosis-respuesta de leucocitos humanos y observamos que el área de la señal de DBD-FISH aumenta linealmente en el rango de dosis estudiado, tanto en los nucleoides como en los cometas ( $r^2=0,98$  para los nucleoides y  $0,91$  para los cometas). En relación con la intensidad media de fluorescencia de las señales de DBD-FISH, también observamos un incremento lineal en el rango de dosis analizado ( $r^2=0,90$  en los nucleoides y  $0,91$  en los cometas). Olive et al., en 1999 demostraron que los cometas neutros pueden detectar roturas de cadena doble si se emplean dosis de irradiación elevadas y lisis fuertes. Las dosis de irradiación elevadas son necesarias ya que las roturas de cadena doble se producen unas 25-40 veces menos frecuentemente que las roturas de cadena simple. Por otra parte, la aplicación de una lisis fuerte permite la migración de los dúplex rotos. Nuestro protocolo satisface estas dos condiciones (Olive y Banáth, 1993; Sarkaria, 1998). De hecho, la concentración de SDS, la elevada concentración de sales, y principalmente el DTT, permitían la eliminación masiva de proteínas en los espermatozoides, los cuales tienen la cromatina altamente condensada (Fernández et al., 2000). Además, este protocolo pone de manifiesto una señal basal de DBD-FISH relativamente alta, de modo que el área del cometa se pudo segmentar fácilmente por el sistema de análisis de imagen. Esto proporcionó una referencia del área precisa para comparar con los resultados obtenidos tras la irradiación. Hay que señalar también que en el protocolo empleado no hubo saturación de la intensidad media de fluorescencia en el rango de dosis administrado.





**Figura 12.** Curvas dosis-respuesta en leucocitos humanos representando el incremento relativo del área con respecto al basal (en pixels), y la intensidad media de fluorescencia (nivel de gris) de la señal de DBD-FISH en los nucleoides (ensayo convencional) y en cometas neutros, hibridado con sonda para genoma total. En el rango de dosis analizado, tanto el área como la intensidad media de fluorescencia, aumentan linealmente (○, DBD-FISH en nucleoides; ▲, DBD-FISH en cometas)

Esta intensidad media de fluorescencia estaría relacionada con la cantidad de roturas de cadena sencilla y con los lugares lábiles alcalinos, ya que corresponde al ADN de cadena sencilla que se ha desnaturalizado por la acción del álcali a partir de los extremos de las roturas (Rydberg, 1975; Vázquez-Gundín et al., 2000). Para la detección simultánea de roturas de cadena sencilla y doble en el mismo cometa neutro será necesario que la intensidad de fluorescencia media aumente linealmente con estas dosis altas, tal como ocurría en el área (Fig. 13). Tal como hemos referido, el protocolo de unwinding empleado, el más restrictivo, permitió que la intensidad de fluorescencia se incrementara sin saturarse, a pesar de usar dosis muy elevadas de rayos X, que originarían una cantidad muy elevada de roturas de cadena sencilla y lugares lábiles alcalinos. Dos publicaciones anteriores han descrito la FISH en cometas (Santos et al., 1997; McKelvey-Martin, et al., 1998). Sin embargo, la hibridación se realizó después de una desnaturalización alcalina muy fuerte o de una desnaturalización convencional con formamida caliente. En ambos casos, el ADN está completamente desnaturalizado por lo que la intensidad de fluorescencia no es proporcional al nivel de roturas del ADN.



**Figura 13.** Señales de DBD-FISH representativas (sonda para el genoma total) en nucleoides (arriba) y en cometas (abajo), resultantes de la exposición de leucocitos humanos a dosis crecientes de rayos X.

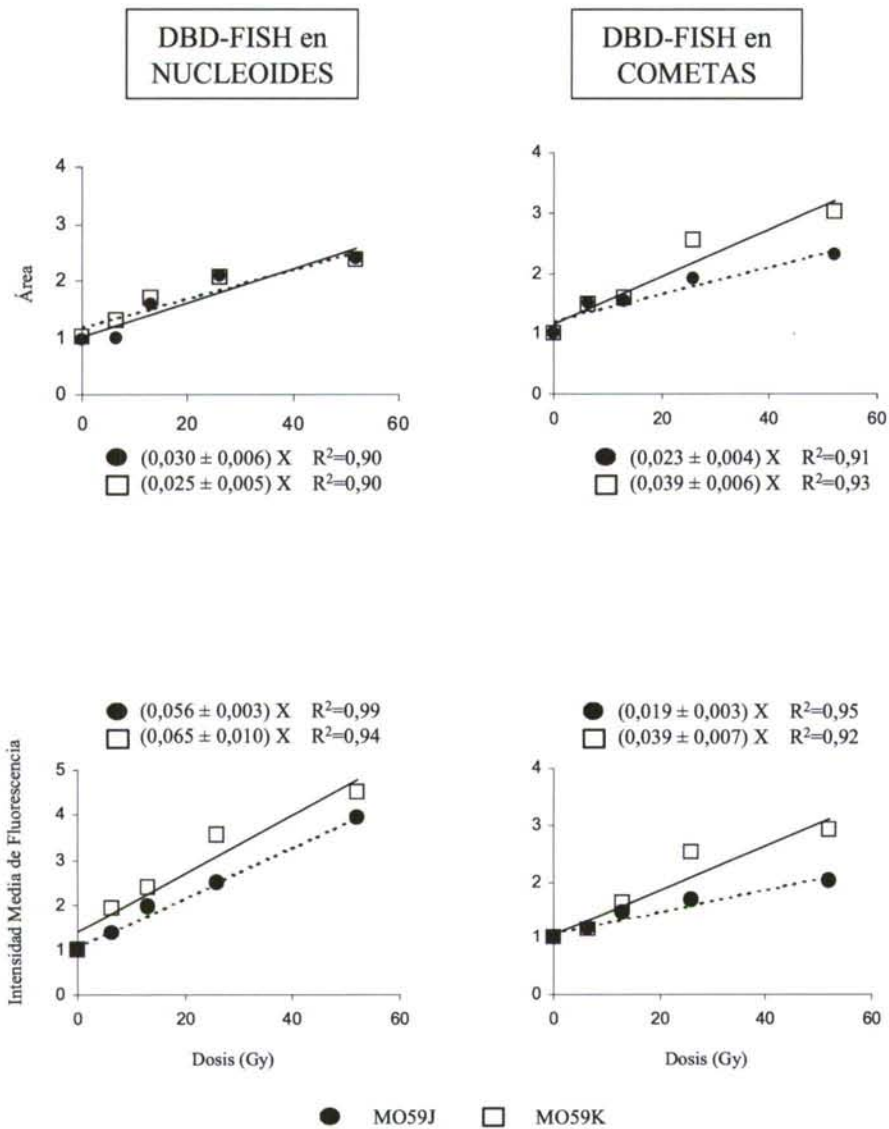
Las roturas de cadena doble se relacionarían con el área de la señal de la DBD-FISH, la cual está relacionada con la migración del ADN ejercida por el paso de electroforesis. Además, se analizaron también otras variables utilizadas de manera rutinaria en el estudio de cometas: la longitud de la cola (distancia en pixels desde el centro de la cabeza al final de la cola) y el momento de cola (porcentaje de la señal de la DBD-FISH en la cola multiplicado por la longitud del cometa), obteniendo con todas ellas los mismos resultados. Las pendientes de las curvas de dosis-respuesta fueron similares:  $0,038 \pm 0,001$  en el área,  $0,037 \pm 0,006$  en la longitud de la cola y  $0,043 \pm 0,005$  en el momento de cola. Este resultado indica que el momento de cola en la técnica DBD-FISH, es en la práctica exclusivamente dependiente de la longitud de la cola, siendo el porcentaje de la señal en la cola invariable con la dosis. Estudios anteriores demostraron que la longitud de la cola del cometa no se incrementa con dosis de irradiación mayores de 20 Gy, a diferencia de la cantidad de ADN en la cola que sí se modifica (Olive et al., 1991). Sin embargo, bajo nuestras condiciones, parece que tanto la longitud de la cola como el área de la señal de DBD-FISH procedentes de cometas neutros aumentaban linealmente con la dosis, y no se saturaban, al menos en el rango de dosis que empleamos. Mediante la técnica DBD-FISH obtuvimos mayor resolución, mostrando una señal de hibridación en el final de la cola que no se detectaba mediante la tinción con DAPI. Quizá, aunque pudiese migrar más ADN desde la cabeza a la cola con la dosis, la dispersión de este ADN en un área de cola mayor conservaría el porcentaje de la intensidad de fluorescencia constante en la cola.

En resumen, el área o longitud de la señal de DBD-FISH estará en relación con las roturas radioinducidas de cadena doble, mientras que la intensidad de esa misma señal nos proporcionará información sobre las roturas de cadena simple. Ambos tipos de lesiones serían valorables en la misma célula, de modo simultáneo. Para comprobar que esta hipótesis era cierta, se realizó una confirmación mediante el análisis simultáneo de roturas de cadena doble y sencilla tanto en una línea celular deficiente en la reparación de roturas de cadena doble como en células tratadas con agua oxigenada y rayos X.

**a) Ensayo en una línea celular deficiente en la reparación de roturas de cadena doble.**

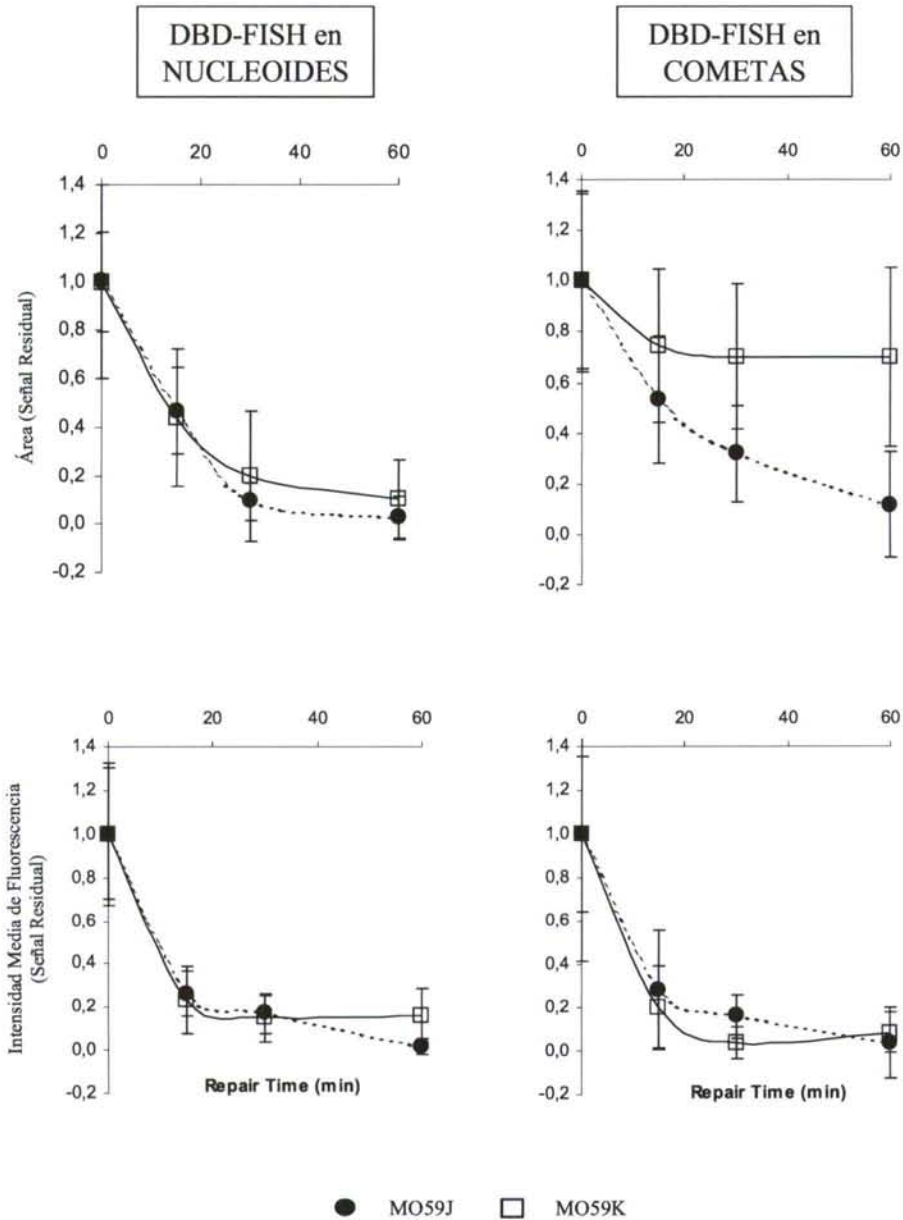
Se realizó la técnica de DBD-FISH en cometas neutros en dos líneas celulares humanas, la MO59J, deficiente en la reparación de roturas de cadena doble, y la línea parental MO59K. Simultáneamente se realizó también la DBD-FISH convencional en nucleoides. La curva de dosis-respuesta obtenida se presenta en la figura 14. El incremento relativo en el área de la célula, al aumentar la dosis de irradiación, con respecto al área celular basal es muy similar tanto en los nucleoides como en los cometas, en ambas líneas celulares, con la excepción de que la línea MO59J es significativamente más sensible (1,7 veces más) en los cometas, siendo la pendiente de esta curva similar a la de leucocitos humanos ( $0,038 \pm 0,001$ ). El aumento relativo de la intensidad media de fluorescencia con respecto al basal fue similar en ambas líneas celulares, en los nucleoides. Sin embargo, la línea MO59J mostró una mayor sensibilidad en la intensidad media de fluorescencia, en los cometas. Como promedio, el aumento relativo de la intensidad media de fluorescencia en DBD-FISH convencional en los nucleoides es tan sensible como en los cometas. Por lo tanto, los nucleoides y los cometas tendrían la misma cantidad de roturas de cadena sencilla inducidas, es decir, la misma cantidad de ADN de cadena sencilla desnaturalizado y por consiguiente de sonda hibridada. Sin embargo, la señal de fluorescencia procedente de la sonda hibridada se concentraba más en los nucleoides, al tener un área más pequeña que en cometas. En consecuencia, los nucleoides muestran una intensidad media de fluorescencia mayor (Fernández et al., 1997).



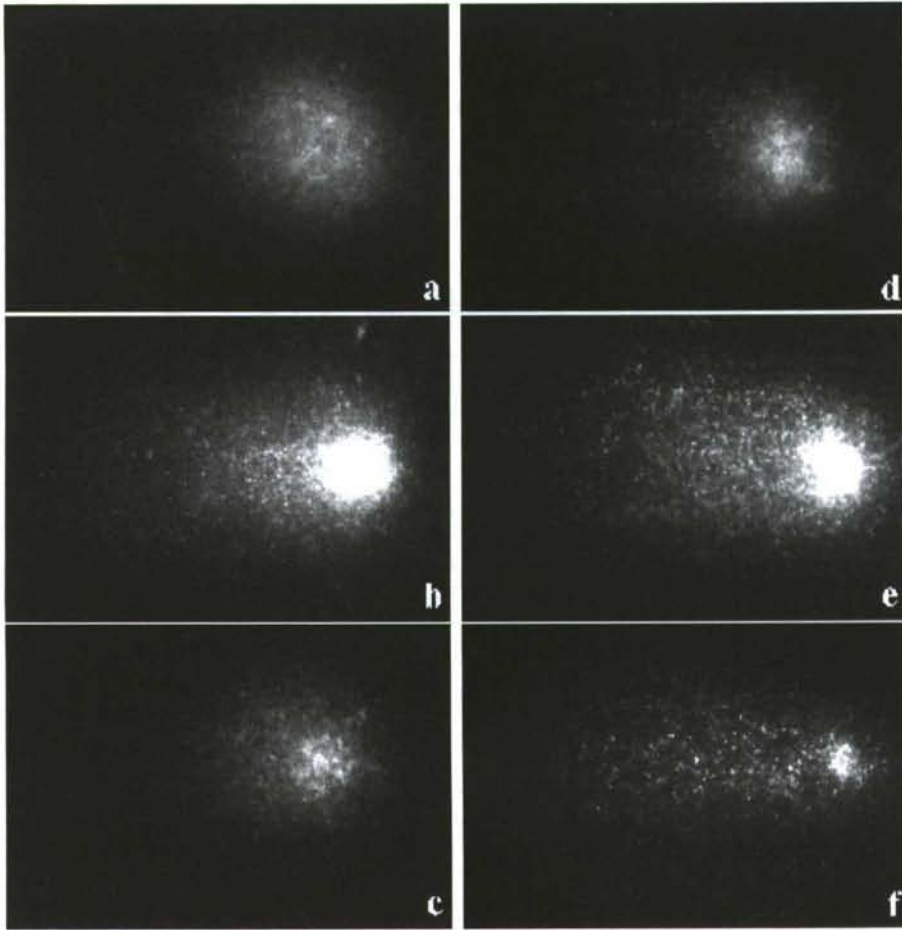


**Figura 14.** Curvas dosis-respuesta de la línea celular MO59J, deficiente en la reparación de dsb, y la línea celular parental MO59K, obtenidas mediante DBD-FISH con sonda para el genoma total, tanto en nucleoides como en cometas neutros. El incremento relativo con respecto al basal en el área y en la intensidad media de fluorescencia de las señales de DBD-FISH se ajustan a rectas. Se indican las pendientes de las curvas, las desviaciones estándar, y los coeficientes  $R^2$ .

Ya que la línea celular MO59J es deficiente en la reparación de roturas de cadena doble, pero no de cadena sencilla, un estudio de reparación podría establecer si los caracteres morfológicos en la señal de DBD-FISH en los cometas están en efecto correlacionados con las roturas de cadena doble, mientras que las roturas de cadena sencilla estarían relacionadas con la intensidad media de fluorescencia. La figura 15 muestra las curvas de reparación obtenidas después de una exposición a 52 Gy. Como se esperaba, la intensidad media de fluorescencia de la señal residual mostró una cinética de reparación rápida, ya que aproximadamente el 80% del daño inicial fue reparado en los primeros 15 minutos, seguido de una fase de reparación más lenta. Este comportamiento es típico de la reparación de roturas de cadena sencilla inducidas por irradiación (Olive, 1999). Además, no encontramos diferencias entre las diferentes líneas celulares ni tampoco entre los nucleoides y los cometas. Por lo tanto, podemos decir que la intensidad media de fluorescencia de la señal de la DBD-FISH de los cometas neutros, así como la de los nucleoides neutros, mide principalmente roturas de cadena sencilla, y lugares lábiles alcalinos radioinducidos. Sin embargo, obtuvimos un resultado diferente al analizar el área de la señal residual de DBD-FISH en los cometas. En este caso se observa que el área se estabiliza tras 15 minutos de reparación, aproximadamente al 70% del daño inicial, en la línea celular mutante, mientras que continúa disminuyendo en la línea celular parental (Fig. 15 y 16). En el mutante radiosensible *xrs-6* derivado de la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1, deficiente en la reparación de roturas de cadena doble, se ha observado un nivel similar de daño residual (80-60%), tras una hora de reparación, aplicando tanto la técnica de los cometas neutros como la electroforesis en gel de campo pulsante (Ross et al., 1995) o técnicas de elución neutra (Kemp et al., 1984).



**Figura 15.** Curvas de reparación del ADN de la línea celular MO59J, deficiente en la reparación de dsb, y la línea celular parental MO59K, obtenidas mediante DBD-FISH con sonda para el genoma total, después de exposición a 52 Gy de rayos X.



**Figura 16.** Señales representativas de DBD-FISH con sonda para el genoma total, en cometas neutros procedentes de la línea celular parental MO59K (a-c) y de la línea celular MO59J, deficiente en la reparación de dsb (d-f). (a, d) Sin irradiar; (b, e) expuestas a 52 Gy de irradiación; (c, f) expuestas a la misma dosis pero permitiendo la reparación durante 60min.

En resumen, el área es el único parámetro en el que observamos diferencias en la reparación de roturas de cadena doble en la línea celular deficiente y en la parental. Esto está a favor de una correlación entre variables morfológicas de la señal de la DBD-FISH en cometas neutros y las roturas de cadena doble radioinducidas.

En el caso de los nucleoides (ensayo convencional de DBD-FISH), el área en la señal residual de DBD-FISH no permitió detectar diferencias en la reparación de roturas de cadena doble entre ambas líneas celulares. En este caso, ambas presentaban una cinética de reparación similar, que no era significativamente diferente a la que se obtuvo

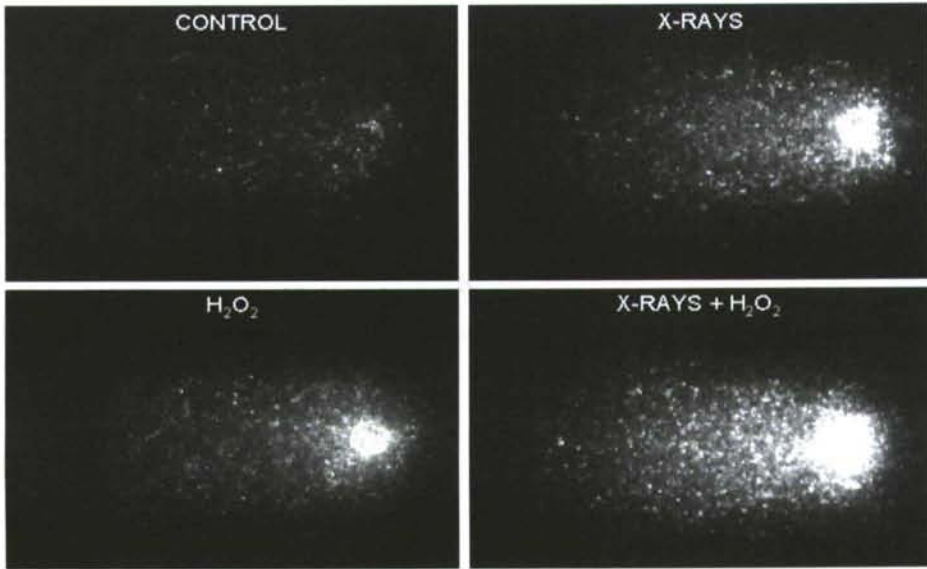


en los cometas de la línea celular parental. A pesar de todo, estas cinéticas de reparación fueron más lentas que las mostradas por la intensidad media de fluorescencia, correspondientes a la reparación de roturas de cadena sencilla. Probablemente el área de la señal de DBD-FISH de los nucleoides es el resultado de la influencia de ambos tipos de roturas, tanto de cadena sencilla como de doble, teniendo esta última un efecto pronunciado, enlenteciendo en la cinética de reparación, pero sin suficiente resolución para ser diferenciado del efecto de las roturas de cadena sencilla en la relajación de los bucles de ADN superenrollados (Roti Roti y Wright, 1987).

#### **b) Ensayo en células tratadas con rayos X y con agua oxigenada.**

Realizamos también la técnica DBD-FISH en cometas neutros de leucocitos humanos expuestos a  $H_2O_2$  (300 $\mu$ M), a rayos X (13 Gy), y a  $H_2O_2$  + rayos X. El  $H_2O_2$  se descompone en radicales hidroxilo (OH $\cdot$ ) y éstos reaccionan con la cromatina dando lugar a roturas de cadena del ADN sencilla. La relación entre roturas de cadena sencilla / roturas de cadena doble para los rayos X es alrededor de 25-40, sin embargo en el  $H_2O_2$  la relación es de 3250 (Olive y Johnston, 1997). Por lo tanto, el  $H_2O_2$  a una concentración de 300 $\mu$ M induce, además de las bases dañadas, principalmente roturas de cadena sencilla en el ADN, detectándose las roturas de cadena doble sólo a partir de una concentración de 30mM y durante un tiempo de 30 minutos (Dahm-Daphi et al., 2000). Consecuentemente las roturas de cadena sencilla inducidas por el tratamiento con  $H_2O_2$  aumentaron la intensidad media de la señal de DBD-FISH en 1,8 veces con respecto al basal de los cometas (Tabla 4; Fig. 17). Los rayos X aumentaron la intensidad media de fluorescencia en 2,3 veces. De acuerdo con otros artículos, utilizando el test de cometas alcalino (Visvardis et al., 1987; Fairbairn et al., 1995), se detecta una heterogeneidad intercelular mas grande en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$  en la intensidad media de fluorescencia que con los rayos X (coeficiente de variación: 75% versus 16%). Las variaciones en la permeabilidad al peróxido, la presencia diferencial de los iones metálicos intracelulares, de enzimas antioxidantes, o de atrapadores de radicales, pueden responder a estas diferencias intracelulares elevadas. Cuando el tratamiento con  $H_2O_2$  se realizó en células irradiadas, la intensidad de fluorescencia media aumentó 3,75 veces con respecto al basal. Evidentemente, el tratamiento con  $H_2O_2$  añadió una cantidad significativa de roturas de cadena sencilla a

las ya inducidas por los rayos X, y esto se refleja en la intensidad de fluorescencia media de los cometas.



**Figura 17.** Señales de DBD-FISH resultantes de la hibridación con sonda para el genoma total en cometas neutros de leucocitos humanos. (a) Sin tratar; (b) tratados con  $H_2O_2$  (300 $\mu$ M); (c) exposición a rayos X (13 Gy); (d)  $H_2O_2$  + rayos X. El tratamiento con  $H_2O_2$  aumentó la intensidad media de fluorescencia, pero no el área, en las células expuestas a rayos X.

**Tabla 4.** Área e intensidad media de fluorescencia de las señales de DBD-FISH, resultantes tras la hibridación con sonda para el genoma total en cometas neutros procedentes de leucocitos humanos tratados con  $H_2O_2$  (300 $\mu$ M), Rayos X (13 Gy), o ambos agentes. Los coeficientes de variación se presentan entre paréntesis.

	Sin tratar	$H_2O_2$	Rayos X	Rayos X + $H_2O_2$
<b>INTENSIDAD MEDIA</b>	216,46 $\pm$ 47,30 (21,85)	391,34 $\pm$ 292,45 (74,73)	494,08 $\pm$ 77,94 (15,77)	811,52 $\pm$ 331,16 (40,81)
<b>ÁREA</b>	45814,16 $\pm$ 8025,74 (17,52)	62479,32 $\pm$ 9808,57 (15,70)	63049,30 $\pm$ 9639,46 (15,29)	66505,35 $\pm$ 9733,12 (14,64)

Sin embargo, el área de la señal de la DBD-FISH de los cometas obtenida por los rayos X, no cambió significativamente cuando añadimos el  $H_2O_2$  (t-Student,  $P < 0.05$ ) (Tabla 3). Esto es, el exceso de roturas de cadena sencilla originadas por el  $H_2O_2$  no modificó el área, ya que este parámetro depende principalmente de las roturas de cadena doble. Otros datos que refuerzan esta hipótesis se derivan del análisis de la variación

intercelular en el área. Mientras que el tratamiento con  $H_2O_2$  da lugar a un coeficiente de variación muy elevado en la fluorescencia media de la señal de DBD-FISH (75%), el área de la misma señal mantuvo una dispersión baja, similar a la de los rayos X (coeficiente de variación de alrededor de 15-20%) (Tabla 4). Esto significa que las células con la señal más fuerte después del tratamiento con  $H_2O_2$  no tienen un área más grande en la señal de DBD-FISH. Aunque el tratamiento con  $H_2O_2$  aumentó el área de la señal significativamente con respecto al basal, este aumento era debido a las roturas de cadena sencilla, y no a las roturas de cadena doble. De hecho, el ensayo del cometa tal como se desarrolló en su versión inicial (Östling y Johanson, 1984), se realizó bajo condiciones neutras utilizando dosis bajas de radiación ionizante. De este modo se detectó la relajación del ADN superenrollado inducida por las roturas de cadena sencilla (Olive y Johnston, 1997).

Los estudios de células deficientes en la reparación de roturas de cadena doble y de células tratadas con rayos X y agua oxigenada, apoyan la hipótesis de que, después de la exposición a rayos X, la intensidad de fluorescencia media de la señal de la DBD-FISH obtenida en cometas neutros está principalmente relacionada con las roturas de cadena sencilla inducidas, mientras que el área de la misma señal está principalmente correlacionada con las roturas de cadena doble. Por esto, DBD-FISH en cometas neutros permite la estima simultánea y fácil de ambos tipos de roturas en el mismo núcleo, célula a célula. Esto podría ser de gran interés cuando se dispone de muy pocas células para establecer tanto las roturas de cadena sencilla como doble. Además, esto integra las ventajas de los cometas y de la DBD-FISH. De hecho, este estudio se realizó analizando el genoma completo, usando una sonda para el genoma total. Sin embargo, se podrían hibridar muchas sondas específicas diferentes, con la posibilidad del análisis simultáneo de la inducción de roturas de cadena sencilla y doble y estudiar la reparación en áreas de secuencia de ADN específicas. En el caso de secuencias concretas de ADN, el área de la señal puede no ser muy informativa de las roturas de cadena doble, debido a que se podría obtener el mismo área hibridada independientemente de la distancia de la migración. En este caso, la determinación de la longitud de migración podría dar una estima más precisa.

***“DBD-FISH on neutral comets:  
simultaneous analysis of DNA  
single-and double-strand breaks in  
individual cells”***



## DBD-FISH on Neutral Comets: Simultaneous Analysis of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Individual Cells

J. L. Fernández,\*<sup>1</sup> F. Vázquez-Gundín,\* M. T. Rivero,\* A. Genescá,<sup>†</sup> J. Gosálvez,<sup>‡</sup> and V. Goyanes§

\*Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, Avda de Montserrat s/n 15009, La Coruña, Spain;

<sup>†</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; <sup>‡</sup>Unidad de Genética,

Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; and §Sección de Genética,

Hospital "Teresa Herrera," Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad de La Coruña, Spain

Human blood leukocytes exposed to X-rays were immersed in an agarose microgel on a slide, extensively deproteinized, and electrophoresed under neutral conditions. Following this single-cell gel electrophoresis assay, characteristics of DNA migration (i.e., area of the comet) are related to the DNA double-strand breaks (dsbs) yield. After electrophoresis, comets were briefly incubated in an alkaline unwinding solution, transforming DNA breaks and alkali-labile sites into restricted single-stranded DNA (ssDNA) motifs. These motifs behave as target sites for hybridization with a whole genome probe, following the DNA breakage detection-fluorescence *in situ* hybridization (DBD-FISH) procedure. As DNA breakage increases with dose, more ssDNA is produced in the comet by the alkali and more DNA probe hybridizes, resulting in an increase in the mean fluorescence intensity. Since radiation-induced DNA single-strand breaks (ssbs) are far more frequent than dsbs, the mean fluorescence intensity of the DBD-FISH signal from the comet is related to the ssb level, whereas the surface area of the same comet signal is indicative of the dsb yield. Thus, both DNA break types may be simultaneously analyzed in the same cell. This was confirmed in a repair assay performing the DBD-FISH on neutral comets from a human cell line defective in the repair of dsbs. Otherwise, treatment with hydrogen peroxide, a main inducer of ssbs, increased the mean fluorescence intensity, but not the surface, of X-ray-exposed human leukocytes. © 2001 Academic Press

**Key Words:** DNA-breakage detection-FISH (DBD-FISH); comet assay; DNA single-strand breaks; DNA double-strand breaks; ionizing radiation; hydrogen peroxide.

### INTRODUCTION

Different methodologies exist to detect radiation-induced DNA breaks. Alkaline sucrose gradient sedimentation, alkaline elution, alkaline DNA precipitation and alkaline unwinding are biochemical techniques that permit the detection of induced DNA single-strand breaks (ssbs). Their variants under neutral conditions allow radiation-induced DNA double-strand breaks (dsbs) to be quantified [1, 2]. Though less frequent, dsbs seem to be more relevant to the production of chromosome aberrations and cell death. Nevertheless, the biochemical techniques cannot detect possible differences in damage induction or repair among the different cells exposed in the field of irradiation.

The intercellular heterogeneity in damage induction or repair can be assessed using particular morphological procedures. Among them, the single-cell electrophoresis assay (comet assay) is of widespread use [3, 4]. This is related to the halo assay, in which nucleoids are generated by protein depletion of cells immersed in an agarose microgel on a slide. The nucleoids are loops attached to residual nuclear matrix proteins. ssbs caused relaxation of supercoiled DNA, resulting in expansion of the halo of DNA loops [5]. Application of an electrophoresis on nucleoids causes the migration of relaxed loops and broken DNA ends toward the anode, constituting a comet image. ssbs increase the DNA migration. The procedure for detecting ssbs was improved by performing a strong alkaline incubation during lysis and/or before and during the electrophoretic step [6]. This intense alkaline treatment causes the denaturation of practically the whole DNA duplex, allowing the single strands to migrate independently. Besides ssbs, alkali-labile sites are also detected since they are transformed into ssbs by the alkali [7].

When the comet assay is performed under neutral conditions, dsbs can be detected. The original comet assay was carried out under neutral conditions but using relatively low doses, so the comet images were dependent on the relaxation of DNA supercoiling by

<sup>1</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Laboratorio de Genética Molecular y Radio-biología, Centro Oncológico de Galicia, Avda de Montserrat s/n, 15009-La Coruña, Spain. Fax: 34-981 287122. E-mail: [genetica@cog.es](mailto:genetica@cog.es).

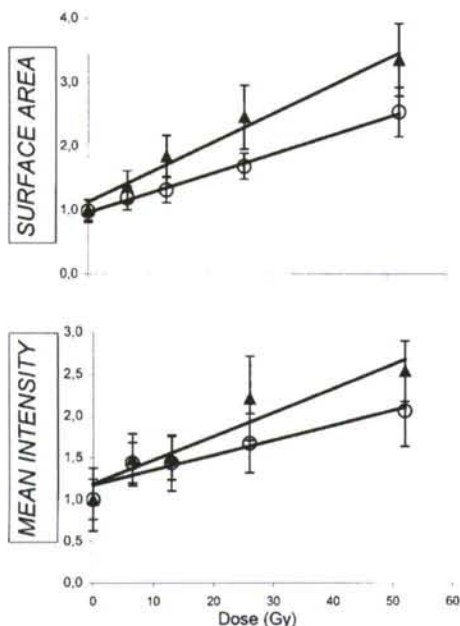


FIG. 1. Dose-response curves in human leukocytes illustrating the relative increase with respect to background of the surface area (in pixels) and mean fluorescence intensity (gray level) of the DBD-FISH signal from nucleoids (conventional assay) and from neutral comets, hybridized with a whole genome probe. In the dose range assayed, the surface area as well as the mean fluorescence intensity increase linearly in both cases ( $\Delta$ , DBD-FISH on nucleoids;  $\circ$ , DBD-FISH on comets).

ssbs [8]. Since dsbs are 25–40 times less frequently induced than ssbs, much higher doses and strong lysis are employed for their detection by the neutral comet assay [4, 9]. Overall, no technique exists for the simultaneous analysis of ssbs and dsbs in the same cell.

We have recently developed a new procedure, DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH), which allows quantification of ssbs and alkali-labile sites in single cells, either in the whole genome or within specific DNA sequences [10]. Cells trapped in an agarose microgel are deproteinized to obtain nucleoids, like in the neutral halo or comet assays. The nucleoids are briefly incubated in an alkaline unwinding solution to produce restricted ssDNA motifs starting from the ends of the DNA breaks. As ssbs and alkali-labile sites increase with dose, more ssDNA is produced by the alkali so more DNA probe can hybridize. This is detected as in current FISH procedures, and quantified using an image analysis system. The DNA probe selects the DNA sequence to be analyzed. Here we have applied the DBD-FISH procedure, hybridizing a whole genome probe, on neutral comets. The resultant signal provides us information simultaneously on radia-

tion induced ssbs + alkali-labile sites and on dsbs within the same cell.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell types.** The work was carried out on human peripheral blood leukocytes in buffy coat and on human cell lines MO59J, repair-deficient for dsbs, and the parental MO59K (ATCC). These cell lines were of fibroblast morphology, isolated from a tumor specimen taken from a 33-year-old male with untreated malignant glioblastoma. Cell lines were grown in monolayer, in the dark, at 37°C, in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics, and L-glutamine, and irradiated under exponentially growing conditions.

**Cell processing.** The DBD-FISH procedure has been described in detail elsewhere [11]. Blood leukocytes in buffy coat or cultured cells mechanically disaggregated and resuspended in RPMI medium were mixed with 1% low-melting point agarose, to give a concentration of 0.7%. Fifty microliters of the cell suspension were pipetted onto a glass slide coated with a thin film of 0.65% standard agarose dried at 80°C, covered with a 24 × 60-mm glass coverslip and stored at 4°C for 5 min. After gelification, the slide was exposed on ice to X-rays 100 kVp (Philips RT-100), administering 0-, 6.5-, 13-, 26-, and 52-Gy doses in transversal strips on the same slide. Immediately after irradiation, the coverslips were removed and the slides were incubated sequentially in two lysing solutions: 0.4 M Tris-HCl, 0.8 M dithiothreitol (DTT), 1% SDS, pH 7.5, 42°C, 45 min, followed by 0.4 M Tris-HCl, 2 M NaCl, 1% SDS, 0.05 M EDTA, pH 7.5, 42°C, 45 min. After washing in 0.9% NaCl, nucleoids were unwound in 0.03 M NaOH, 7°C, 2.5 min.

After alkaline incubation, a neutralization step was performed with 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5 for 5 min. Slides were briefly washed in TBE buffer (0.09 M Tris-Borate, 0.002 M EDTA, pH 7.5), dehydrated in 70, 90, 100% ethanol baths, 2 min each, and air-dried.

Neutral comets were processed in the same way, at the same time as conventional nucleoids, except that after incubation in lysing solutions, the slides were washed in abundant TBE buffer for 10 min, transferred to an electrophoresis chamber, and electrophoresed at 20 V (0.7 V/cm), 12 mA, 15 min, at room temperature (22°C) in TBE buffer. Then they were washed in 0.9% NaCl for 2 min and unwound, neutralized, washed, dehydrated, and air-dried.

For experiments aimed at measuring repair of DNA breaks, cultured cells in monolayer were exposed to X-rays (52 Gy) on ice and then allowed for repair by incubation at 37°C. All the different incubation times were assayed in each slide. This was carried out by pipetting 8  $\mu$ l of the cell-agarose suspension from each repair time onto separate areas of the same slide, which were covered with a 16 × 16-mm coverslip. Thus, all different repair times were simultaneously processed, under the same conditions.

Other experiments of DBD-FISH on neutral comets were performed on human blood leukocytes to analyze the interaction effect between hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and X-rays. In this case, half of the microgel was exposed to X-rays (13 Gy), on ice. Then, half of the unirradiated and half of the irradiated areas were treated with 50  $\mu$ l of  $H_2O_2$  (300  $\mu$ M), covered with a plastic coverslip, and incubated at 4°C for 5 min. Previously, the microgel between the borders of the  $H_2O_2$ -treated strips and the contiguous areas was scraped, to avoid diffusion of the  $H_2O_2$  solution. Thus, untreated,  $H_2O_2$ -treated, X-ray exposed, and X-ray +  $H_2O_2$ -treated areas were processed under similar conditions on the same slide.  $H_2O_2$  was washed twice in abundant 0.9% NaCl and the material on the slides was lysed, electrophoresed, and unwound.

**FISH.** Thirty microliters of a human whole genome probe biotin-labeled by nick-translation (4.3 ng/ $\mu$ l in 50% formamide/2× standard sodium citrate (SSC) pH 7, 10% dextran sulfate, 100 mM calcium phosphate) was pipetted on dried slides and incubated overnight at room temperature. The slides were washed twice in 50% form-



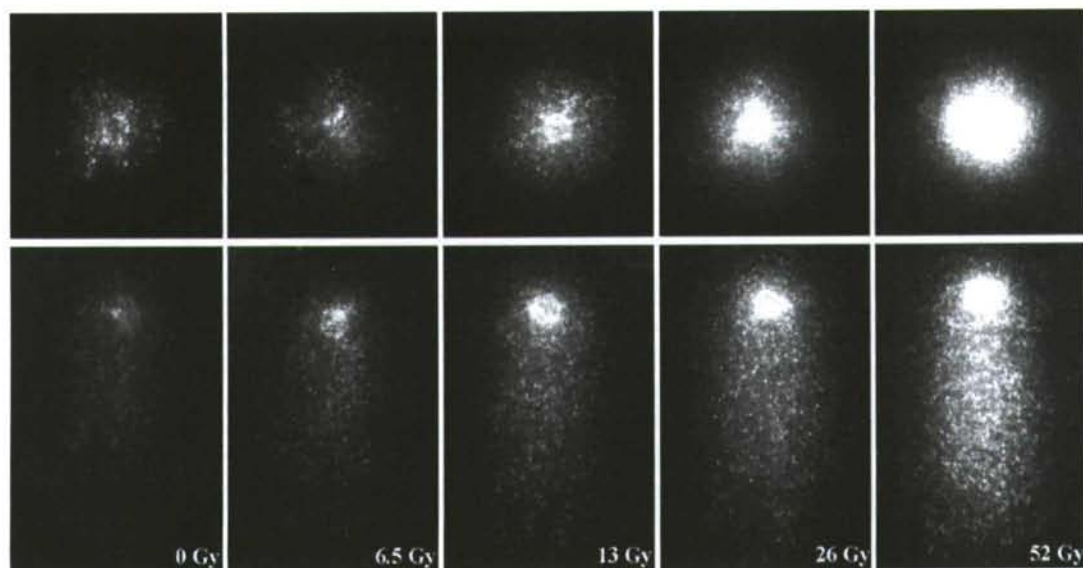


FIG. 2. Representative DBD-FISH signals (whole genome probe) from nucleoids (top) and from neutral comets (bottom), resulting from exposure of human leukocytes to increasing doses of X-rays.

amide/2× SSC, pH 7, 5 min, and twice in 2× SSC, pH 7, 3 min, at room temperature. The bound probe was detected with streptavidin-Cy3 (1:200) and the nucleoids-comets counterstained with DAPI (2 µg/ml) in Vectashield (Vector).

**Fluorescence microscopy and digital image analysis.** Signals were viewed under a DMRB epifluorescence microscope (Leica) equipped with a DMRD photoexposer, using PL Fluotar 100× or 40× objectives and appropriate fluorescence filters. Images were acquired using a high-sensitivity CCD camera (Ultramax 1600, Astrocam) which distinguishes over 16,000 gray levels and allows subtraction of the current dark image and correction for nonuniform sample illumination. Groups of 50 digital images were taken for each experimental point in similar conditions, stored in the file format of the camera (.apf) and then converted to .img files. Each experiment was repeated at least twice. Image analysis was performed using a macro designed with Visilog 5.1 software (Nosis). This allows for thresholding and background subtraction and measures the surface area (in pixels) and mean fluorescence intensity (mean gray level) of the signals.

In dose-response studies, the relative increase in the surface area and mean fluorescence intensity of the fluorescent signal with respect to that of the unirradiated sample was plotted as a function of dose. In the case of repair studies, the surface area and mean fluorescence intensity from unirradiated sample was subtracted from that of the irradiated sample. The remaining surface area and mean intensity were plotted as a function of repair time. Statistical analysis was carried out using Student's *t* test and one and two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Conditions of Lysis and Unwinding for Simultaneous Detection of ssbs and dsbs*

The protocol, as described under Materials and Methods, was performed either on nucleoids, following

the conventional DBD-FISH procedure, or on neutral comets, if intercalating a neutral electrophoresis step between lysis and unwinding. Figure 1 reveals that the surface area of the DBD-FISH signal increased linearly in the dose range assayed, in both nucleoids and comets ( $r^2 = 0.98$  for nucleoids, and 0.99 for comets). In relation to the mean fluorescence intensity of the DBD-FISH signal, it maintained a linear increase in the dose range assayed ( $r^2 = 0.90$  for nucleoids and 0.91 for comets). Olive *et al.* [9] suggested that neutral comets may detect dsbs if high radiation doses and strong lysis conditions were used. High radiation doses are necessary since dsbs are 25–40 times less frequently induced than ssbs. Moreover, a strong lysis allows broken duplexes to migrate. Our protocol satisfied these conditions [12, 13]. In fact, concentrated SDS, high-salt, and mainly DTT, allowed extensive protein removal in sperm cells, which have a very highly condensed chromatin [14]. Furthermore, this protocol shows a relatively strong DBD-FISH background signal, so the whole comet surface, as visualized in DAPI staining, was easily segmented by the image analysis system. This provided an accurate surface reference to compare with results obtained following irradiation. Finally our protocol did not saturate the mean fluorescence intensity within the range of doses employed. This variable should be related to the amount of ssbs and alkali-labile sites, i.e., the amount of ssDNA unwound by the alkali, starting from each end of a break [15–17]. Since high doses are necessary to study in-

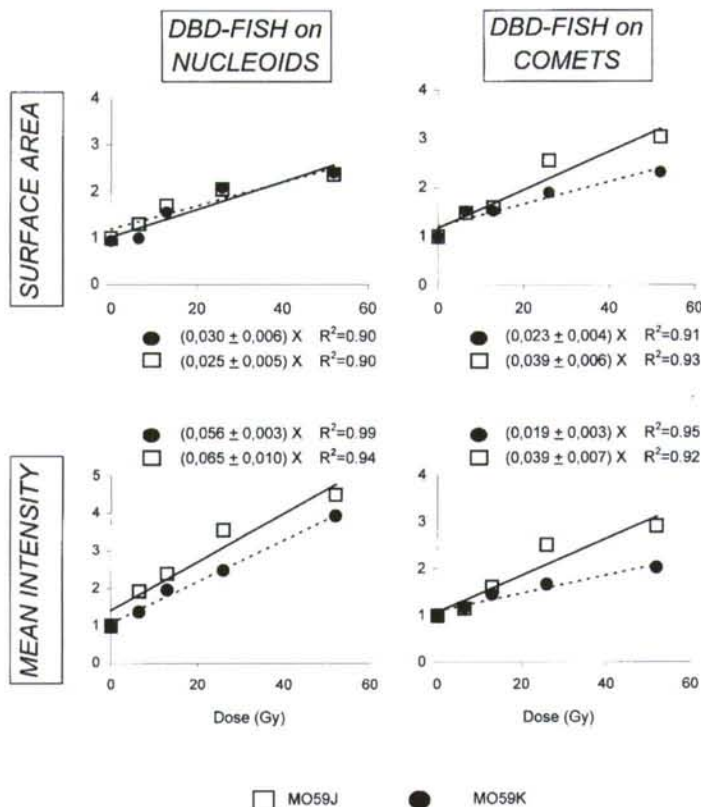


FIG. 3. Dose-response curves from the human cell line MO59J, dsb repair-deficient, and the parental cell line MO59K, obtained by DBD-FISH with a whole genome probe either on nucleoids or on neutral comets. The relative increase with respect to background in the surface area and in the mean fluorescence intensity of the DBD-FISH signals fitted to linear curves. The slopes of the curves and their standard deviations are indicated.

duced dsbs, simultaneous detection of ssbs in the same neutral comet implies that the mean intensity should keep increasing linearly with these high doses, as the surface area did (Fig. 2). Two reports had previously described FISH on comets [18, 19]. Nevertheless, the hybridization was performed after a very strong and prolonged alkaline, or conventional heat-formamide, denaturation. In both cases, the whole DNA is completely denatured so the fluorescence intensity is not proportional to the DNA breakage level.

Since the surface area of the DBD-FISH signal is related to the DNA migration exerted by the electrophoretic step, this variable should be related to the dsb yield. Other variables routinely used for comet analysis were established. All of them—surface area, tail length (distance in pixels from the center of the head to the end of the tail), and tail moment (percentage of DBD-FISH signal in the tail multiplied by the comet

length)—yielded similar results. The slopes of the fitted linear dose-response curves were similar:  $0.038 \pm 0.001$  for surface area,  $0.037 \pm 0.006$  for tail length, and  $0.043 \pm 0.005$  for tail moment. This result indicates that the tail moment in DBD-FISH is in practice exclusively dependent on the tail length, the percentage of signal in the tail being unchanged with dose. Olive *et al.* [20] reported that the comet tail does not increase for radiation doses above 20 Gy, unlike the amount of DNA in the tail. Under our conditions it seems that tail length, and the closely related surface area, of the DBD-FISH signal from the neutral comets increased linearly with dose, and did not saturate, at least in the dose range employed by us. Furthermore, the tail length or surface area of the comet was higher with DBD-FISH signal than with DAPI staining (data not shown). DBD-FISH had a much higher resolution, showing a hybridization signal at the end of the tail



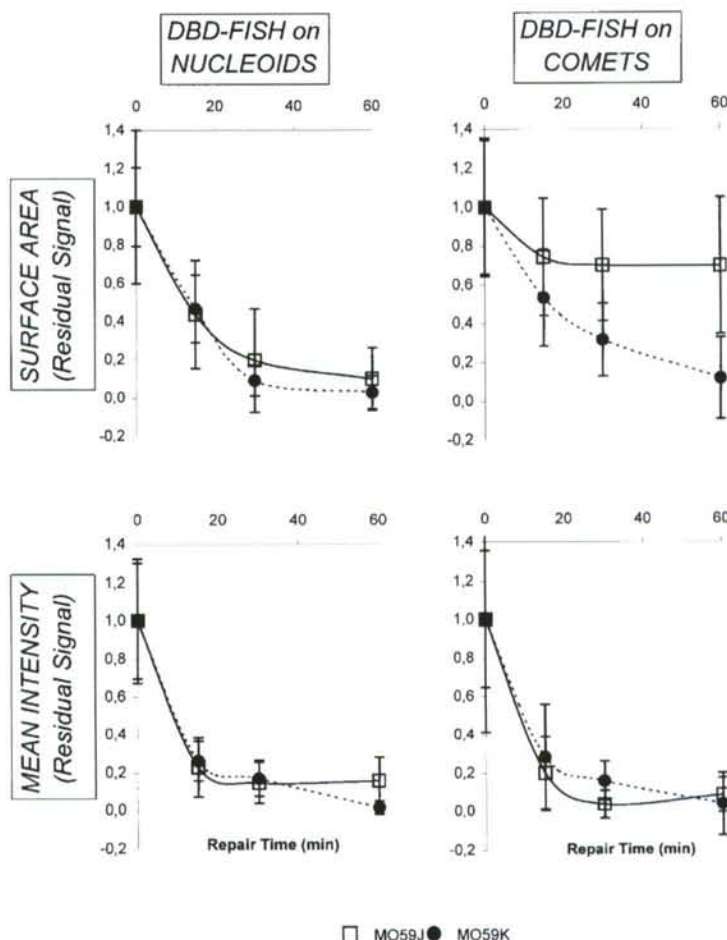


FIG. 4. DNA repair curves from the human cell line MO59J, dsb repair-deficient, and the parental cell line MO59K, obtained by DBD-FISH with a whole genome probe after exposure to 52 Gy of X-rays.

that was not detected by DAPI staining. Perhaps, though more DNA could migrate from the head to the tail with dose, dispersion of this DNA in a greater tail surface should keep the percentage of fluorescence intensity constant in the tail.

#### Confirmation of the Simultaneous Analysis of ssbs and dsbs

*a. Assay on a dsb repair-deficient cell line.* DBD-FISH on neutral comets, was performed on two human cell lines: MO59J, repair-deficient in dsbs, and the parental MO59K. Conventional DBD-FISH on nucleoids was simultaneously processed. The dose-response is presented in Fig. 3. The relative increase in surface

area with respect to background was very similar in nucleoids and comets, and in both cell lines, except that the MO59J was significantly more sensitive (1.7 times) in comets. The slope of its fitted linear curve is similar to that for human blood leukocytes ( $0.038 \pm 0.001$ ). The relative increase of mean fluorescence intensity with respect to background was similar in both cell lines in nucleoids. Nevertheless, the MO59J also appeared twice as sensitive for this variable in comets. On average, the relative increase in mean intensity in conventional DBD-FISH on nucleoids was twice as sensitive as DBD-FISH on comets. Both nucleoids and comets should have the same amount of induced ssbs, i.e., the same amount of unwound ssDNA and subse-

quent hybridized probe. Nevertheless, the fluorescence signal from this hybridized probe was concentrated in a smaller surface area in nucleoids than in comets, thus resulting in a stronger mean intensity [21]. This same phenomenon was evident in human blood leukocytes (Fig. 1) where the relative increase in mean intensity in nucleoids (slope,  $0.037 \pm 0.007$ ) was 1.6 times greater than in comets (slope,  $0.023 \pm 0.004$ ).

Since the MO59K cell line is deficient in repairing dsbs, but not ssbs, a repair study could establish if morphological characters of the DBD-FISH signal on comets were indeed correlated to dsbs, whereas mean intensity was related to ssbs. Figure 4 shows the repair curves obtained after exposed to 52 Gy of X-rays. As expected, the mean intensity of the residual signal showed a rapid repair of around 80% of the initial damage in the first 15 min, following with a slow repair phase. This behavior is typical of radiation-induced ssb repair [9]. Furthermore, no differences were found between cell lines, nor between nucleoids and comets. Thus, mean fluorescence intensity of DBD-FISH signal from neutral comets, as well as from neutral nucleoids, measures mainly radiation-induced ssbs. Nevertheless, a different result was obtained when analyzing the surface area of the residual DBD-FISH signal from comets. In this case, it was remarkable that this character stabilized at 70% of the initial damage after 15 min of repair in the mutant cell line, whereas it continued decreasing in the parental cell line (Figs. 4 and 5). A similar level of residual damage (80–60%) was reported in the *xrs-6* radiosensitive mutant derived from Chinese hamster ovary cell line CHO-K1, deficient for dsb repair, either using the neutral comet or the pulse-field gel electrophoresis assays [22] or the neutral elution technique [23]. Overall, the surface area was the only character in which a difference was observed between the dsb-deficient repair and the parental cell line. This argued in favor of a correlation between morphological variables of the DBD-FISH signal in neutral comets and the radiation-induced dsb yield.

In the case of nucleoids (conventional DBD-FISH assay), the surface of the residual DBD-FISH signal did not detect the difference in dsb repair between both cell lines. In this case, both exhibited similar repair kinetics, which otherwise was not significantly different to that obtained in comets from the parental cell line. Nevertheless, this repair kinetics was slower than that shown by the mean fluorescence intensity, corresponding to ssb repair. Probably, surface area of DBD-FISH signal from nucleoids is the result of the influence of both ssbs and dsbs, the latter having a pronounced effect, slowing the repair kinetics, but without sufficient resolution to be differentiated from the effect of ssbs on the relaxation of supercoiling of DNA loops [5].

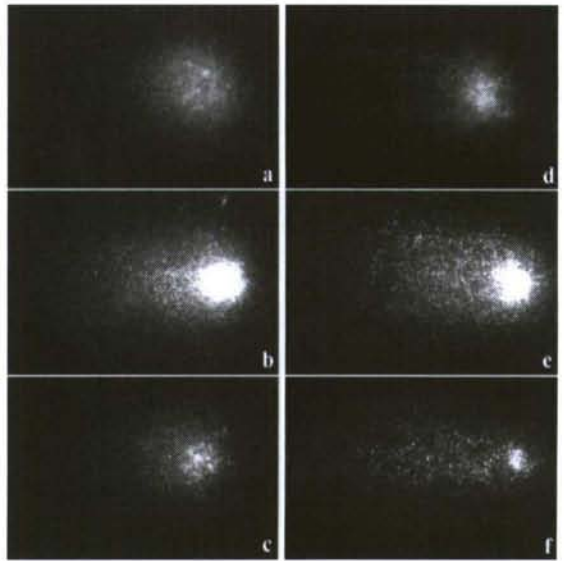


FIG. 5. Representative DBD-FISH signals with a whole genome probe from neutral comets from the parental cell line MO59K (a–c) and the dsb repair-deficient cell line MO59J (d–f). (a, d) Unirradiated; (b, e) exposed to 52 Gy of X-rays; (c, f) exposed to the same dose but allowing 60 min of repair.

*b. Assay on X-rays and  $H_2O_2$ -treated cells.* DBD-FISH on neutral comets was performed on human blood leukocytes exposed to  $H_2O_2$  (300  $\mu$ M), X-rays (13 Gy), and  $H_2O_2$  + X-rays.  $H_2O_2$  decomposes into hydroxyl radicals ( $OH^\bullet$ ) through catalysis by low valence transition metal ions in Fenton–Haber–Weiss-type reactions.  $OH^\bullet$  radicals react with chromatin producing single damage sites. In fact, whereas the ssb/dsb ratio for X-rays is around 25–40,  $H_2O_2$  shows a ratio of 3250 [24]. Thus, 300  $\mu$ M  $H_2O_2$  induces, besides damaged bases, only ssbs in DNA, dsbs having been detected only after 30 mM for 30 min, using neutral gel electrophoresis [25]. Consequently ssbs induced by  $H_2O_2$  treatment increased the mean intensity of the DBD-FISH signal by 1.8 times with respect to background comets (Table 1; Fig. 6). X-rays increased the mean intensity by 2.3 times. According to other reports using the alkaline comet test (e.g., [4, 26]), we also detected a much greater intercellular heterogeneity for mean intensity in response to  $H_2O_2$  treatment than for X-rays (coefficient of variation: 75% vs 16%). Variations in peroxide permeability, intracellular metal ions, antioxidant enzymes, or radical scavengers may account for these high intercellular differences. When  $H_2O_2$  treatment was performed on X-irradiated cells, the mean fluorescence intensity increased by 3.75 times with respect to the background. Evidently,  $H_2O_2$  treatment added a very significant extra amount of ssbs to that



TABLE 1

Surface and Mean Fluorescence Intensity of the DBD-FISH Signals Resulted after Hybridization of a Whole Genome Probe on Neutral Comets from Human Blood Leukocytes Treated with  $H_2O_2$  (300  $\mu M$ ), X-rays (13 Gy), or Both Agents

	Untreated		$H_2O_2$		X-rays		X-rays + $H_2O_2$	
Mean intensity	216.46 $\pm$	47.30 (21.85)	391.34 $\pm$	292.45 (74.73)	494.08 $\pm$	77.94 (15.77)	811.52 $\pm$	331.16 (40.81)
Surface	45814.16 $\pm$	8025.74 (17.52)	62479.32 $\pm$	9808.57 (15.70)	63049.30 $\pm$	9639.46 (15.29)	66505.35 $\pm$	9733.12 (14.64)

Note. The coefficient of variation is presented in parentheses.

induced by X-rays, and this is reflected in the mean fluorescence intensity of the comets.

Nevertheless, the surface area of the DBD-FISH signal from comets obtained by X-rays, did not change significantly when  $H_2O_2$  was added (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ) (Table 1). Thus, the excess of ssbs originated by  $H_2O_2$  did not modify the surface, since this parameter must be mainly dependent on dsbs. Other support for this affirmation is derived from the analysis of the intercellular variation in surface area. Whereas  $H_2O_2$  treatment gave rise to a very large coefficient of variation in the mean fluorescence of the DBD-FISH signal (75%), the surface area of the same signal maintained a low dispersion, similar to that of X-rays (coefficient of variation of around 15–20%) (Table 1). This means that cells with the stronger signal after  $H_2O_2$  treatment did not have a greater surface area in the comet DBD-FISH signal. Though  $H_2O_2$  treatment increased the surface of the signal significantly with respect to the background, this increase was due to ssbs and not to dsbs. In fact, the initial comet assay [8] was performed

under neutral conditions using low doses of ionizing radiation. So it detected the loss of DNA supercoiling induced by ssbs [24].

Overall, the studies on dsb repair-deficient cells and on X-rays +  $H_2O_2$ -treated cells support the hypothesis that, after X-ray exposure, the mean fluorescence intensity of the DBD-FISH signal obtained in neutral comets is mainly related to the induced ssbs, whereas the surface area of the same signal is mainly correlated with dsb yield. Thus, DBD-FISH on neutral comets allows the easy and simultaneous estimation of both DNA break types in the same nucleus, cell by cell. This could be of great interest when very few cells are available for establishing both ssbs and dsbs. Furthermore, this integrates the advantages of both the comet test and DBD-FISH. In fact, the present study was performed, analyzing the overall genome, using a whole genome probe. However, many different specific probes could be hybridized, with the possibility of simultaneous analysis of ssb and dsb induction and repair within specific DNA sequence areas. In the case of

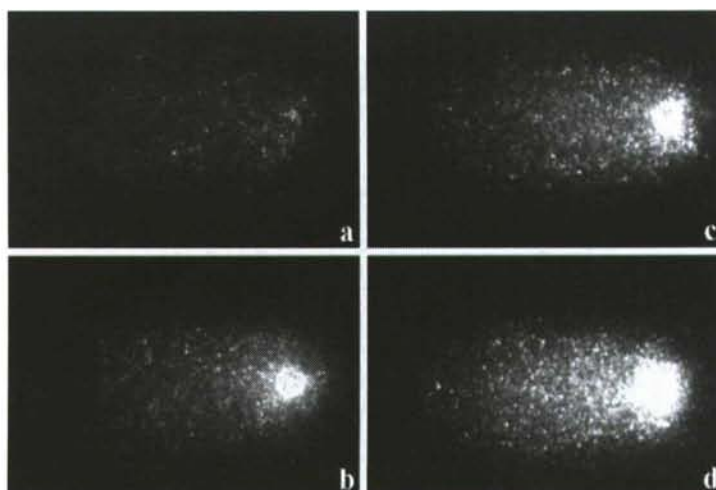


FIG. 6. DBD-FISH signals resulting from hybridization with a whole genome probe on neutral comets from human blood leukocytes. (a) Untreated; (b)  $H_2O_2$ -treated (300  $\mu M$ ); (c) X-ray-exposed (13 Gy); (d)  $H_2O_2$  + X-ray-treated.  $H_2O_2$  treatment increased the mean fluorescence intensity, but not the surface area, of X-ray-exposed cells.

specific DNA sequences, the surface area of the signal may not be very informative of the dsb yield, since a same hybridized surface could be obtained independently of the migration distance. In this case, migration length could provide a more accurate estimate.

This work was supported by grants from the European Atomic Energy Community (Fifth Framework Programme, FIGH-CT1999-00009, TELORAD) and for the Consejo de Seguridad Nuclear (Spain). We thank Dr. Phil Mason for improving the English style of the manuscript.

## REFERENCES

- Ahnström, G. (1988). Techniques to measure DNA strand breaks in cells: A review. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 695–707.
- Olive, P. L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.* **150**(Suppl.), S42–S51.
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Méo, M. P., and Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.* **288**, 46–63.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., and O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* **339**, 37–59.
- Roti Roti, J. L., and Wright, W. D. (1987). Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: Assays for DNA damage and repair. *Cytometry* **8**, 461–467.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191.
- von Sonntag, C. (1987). "The Chemical Basis of Radiation Biology." Taylor and Francis, London.
- Östling, O., and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291–298.
- Olive, P. L. (1999). DNA damage and repair in individual cells: Applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 395–405.
- Fernández, J. L., Goyanes, V. J., Ramiro-Díaz, J., and Gosálvez, J. (1998). Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet. Cell Genet.* **82**, 251–256.
- Fernández, J. L., and Gosálvez, J. (in press). Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). In "In situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols" (V. Didenko, Ed.), Humana Press, Totowa, NJ.
- Olive, P. L., and Banáth, J. P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and  $^{125}\text{I}$ Urd. *Int. J. Radiat. Biol.* **4**, 349–358.
- Sarkaria, J. N., Bush, C., Eady, J. J., Peacock, J. H., Steel, G. G., and Yarnold, J. R. (1998). Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiat. Res.* **150**, 17–22.
- Fernández, J. L., Vázquez-Gundín, F., Delgado, A., Goyanes, V. J., Ramiro-Díaz, J., de la Torre, J., and Gosálvez, J. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: Technical variants evidence different structural features. *Mutat. Res.* **453**, 77–82.
- Rydberg, B. (1975). The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Radiat. Res.* **61**, 274–287.
- Bunch, R. T., Gewirtz, D. A., and Povirk, L. F. (1995). Ionizing radiation-induced DNA strand breakage and rejoining in specific genomic regions as determined by an alkaline unwinding/Southern blotting method. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**, 553–562.
- Vázquez-Gundín, F., Gosálvez, J., de la Torre, J., and Fernández, J. L. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH): Effect of unwinding time. *Mutat. Res.* **453**, 83–88.
- Santos, S. J., Singh, N. P., and Natarajan, A. T. (1997). Fluorescence *in situ* hybridization with comets. *Exp. Cell Res.* **232**, 407–411.
- McKelvey-Martin, V. J., Ho, E. T. S., McKeown, S. R., Johnston, S. R., McCarthy P. J., Rajab, N. F., and Downes C. S. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* **13**, 1–8.
- Olive, P. L., Wlodek, D., and Banáth, J. P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* **51**, 4671–4676.
- Fernández, J. L., Valverde, D., Goyanes, V., Buño, I., and Gosálvez, J. (1997). Alu I *in situ* digestion of human aliphoid and classical satellite DNA regions. High-resolution digital image analysis of FISH signals from condensed and extended chromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* **76**, 94–100.
- Ross, G. M., Eady, J. J., Mithal, N. P., Bush, C., Steel, G. G., Jeggo, P. A., and McMillan, T. J. (1995). DNA strand break rejoining defect in *xrs-6* is complemented by transfection with the human *Ku80* gene. *Cancer Res.* **55**, 1235–1238.
- Kemp, L. M., Sedgwick, S. G., and Jeggo, P. A. (1984). X-Ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat. Res.* **132**, 189–196.
- Olive, P. L., and Johnston, P. J. (1997). DNA damage from oxidants: Influence of lesion complexity and chromatin organization. *Oncol. Res.* **9**, 287–294.
- Dahm-Daphi, J., Sab, C., and Alberti, W. (2000). Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 67–75.
- Visvardis, E. E., Tassiou, A. M., and Piperakis, S. M. (1987). Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\gamma$ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* **383**, 71–80.

Received March 16, 2001

Revised version received July 12, 2001

Published online September 11, 2001



***3. Patrones de migración del ADN  
en electroforesis de células aisladas,  
incluidas en microgel, en dos  
dimensiones***

Con el fin de analizar los mecanismos de migración del ADN durante la electroforesis, realizamos tres variantes experimentales, en las dos primeras, tras la primera electroforesis neutra, se realizó la desnaturalización alcalina, y posteriormente se realizó una segunda electroforesis a  $90^\circ$  de la primera, es decir girando los portaobjetos  $90^\circ$  en la cubeta de electroforesis, tanto en condiciones alcalinas (experimento 1) como en condiciones neutras (experimento 2). También se realizó una electroforesis neutra giro de  $90^\circ$ , y electroforesis neutra (experimento 3) (Fig. 18).

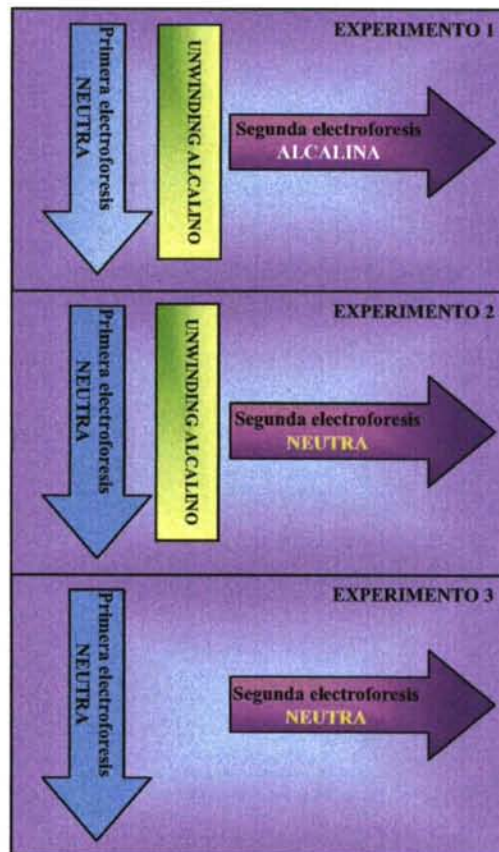


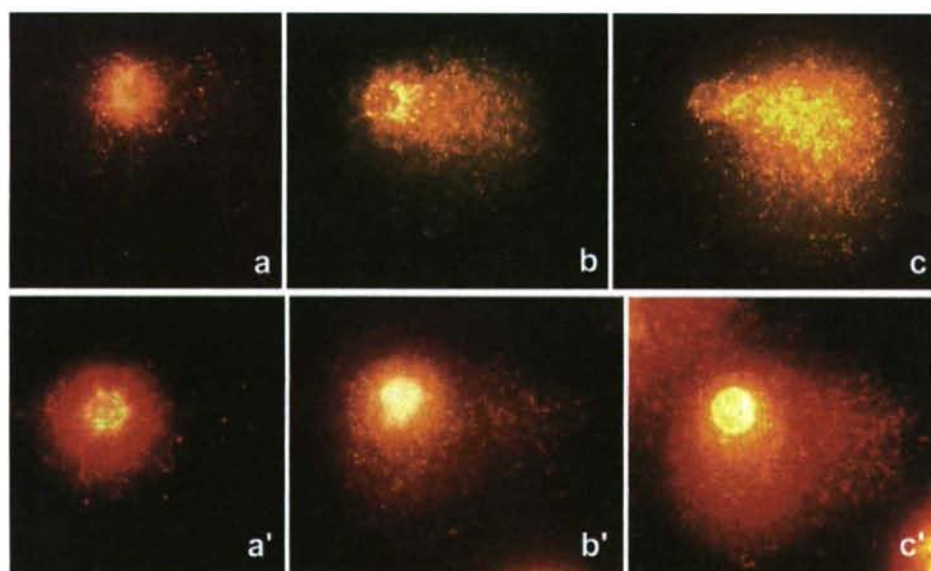
Figura 18. Esquema de los pasos seguidos en los tres experimentos.

*Modelo de migración del ADN después de la segunda electroforesis alcalina o neutra.*

En la figura 19a-c se muestran las imágenes obtenidas cuando se realizó el experimento 1 (Electroforesis neutra - desnaturalización alcalina - 90° Electroforesis alcalina). Cuanto mayor es la dosis de rayos X, mayor es la migración del ADN durante la primera electroforesis (tabla 5), y la cantidad de ADN va disminuyendo progresivamente desde la cabeza al extremo de la cola en este primer cometa. En esta primera electroforesis neutra se origina un cometa neutro, donde el ADN migra únicamente en conformación de doble cadena. La desnaturalización alcalina durante los pasos de unwinding y electroforesis origina tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de las roturas, de modo que se genera más cantidad de ADN de cadena sencilla a medida que aumenta la dosis de irradiación. A escala macromolecular, la concentración local de moléculas "atrapadoras" y de diferentes estructuras de la cromatina pueden influir en la distribución del daño radioinducido (Vázquez-Gundín et al., 2002). Sin embargo, desde un punto de vista práctico, cuando se trabaja con el núcleo completo, se puede considerar que el daño producido se distribuye al azar. A este nivel, las diferencias de daño en el ADN en regiones de cromatina pequeñas se asume que son insignificantes en comparación con el daño global en todo el genoma, de modo que las áreas con mayor concentración de ADN deberían contener mayor cantidad de daño. Así, la desnaturalización alcalina durante los pasos de unwinding y electroforesis origina más ADN de cadena sencilla en la cabeza que en la cola, dando lugar a un marcaje más intenso del ADN que migra desde la cabeza como resultado de la segunda electroforesis.

Analizando el modelo de migración del ADN resultante de la segunda electroforesis alcalina, se observa que la movilidad del ADN desde la cabeza del cometa generado por la primera electroforesis, es heterogénea, con una continuidad en la movilidad del ADN que podemos clasificar en grande, mediana y pequeña (Fig. 19c 20a, a', a'' y tabla 5). En el medio de la cola del primer cometa, la migración es menos heterogénea, con movilidad del ADN grande y mediana. Finalmente, en el extremo de la cola, la migración es homogénea, y sólo tiene ADN de gran movilidad, y no se aprecia marcaje en la cola formada durante la primera electroforesis. Entonces, la migración del ADNcs en la electroforesis alcalina (90° de la primera electroforesis) es progresivamente más homogénea, moviéndose desde la cabeza a la cola del cometa

obtenido en la primera electroforesis. Durante esta segunda electroforesis alcalina, la longitud del ADNcs aumenta con el tiempo y estos tramos de ADNcs tienden a no interactuar entre ellos debido a las condiciones de la desnaturalización. Ya que la cantidad de ADN disminuye progresivamente desde la cabeza al extremo de la cola en el primer cometa, hay progresivamente menos ADNcs desde la cabeza a la cola, de modo que este ADNcs estaría menos entrelazado, aumentando así su libertad para ser movilizado durante la segunda electroforesis. Esto se ve reflejado en las medidas de intensidad total de fluorescencia de las áreas que contienen el ADN migrado (tabla 4).



**Figura 19.** Señales de DBD-FISH tras la hibridación con sonda para el genoma total (verde) en cometas bidimensionales obtenidos en leucocitos sanguíneos humanos expuestos a 0 (a, a'), 13 (b, b'), y 39 (c, c') Gy de rayos X. Después de la primera electroforesis neutra (de arriba abajo), el cometa inicial fue desnaturalizado brevemente, y entonces se realizó otra electroforesis de izquierda a derecha bajo condiciones alcalinas (a, b, c) o neutras (a', b', c').



**Tabla 5.** Datos de dosis-respuesta cuantitativos (media±desviación estándar) procedentes de DBD-FISH con sonda para el genoma total y SCGE en dos dimensiones.

SCGE, electroforesis en gel en células individuales; DBD-FISH, detección de roturas en el ADN mediante hibridación in situ fluorescente. Se analizaron 45 células por punto experimental. Excepto en los cometas que no migraron (0) y en los que el máximo de la longitud de migración desde la cabeza en el caso de la segunda electroforesis neutra, para 13 y 39 Gy, todos los datos fueron estadísticamente significativos con la dosis (test t-Student,  $P<0,05$ , con los ajustes apropiados realizados para las comparaciones múltiples).

<sup>a</sup> Las medidas se realizaron desde el centro de la cabeza.

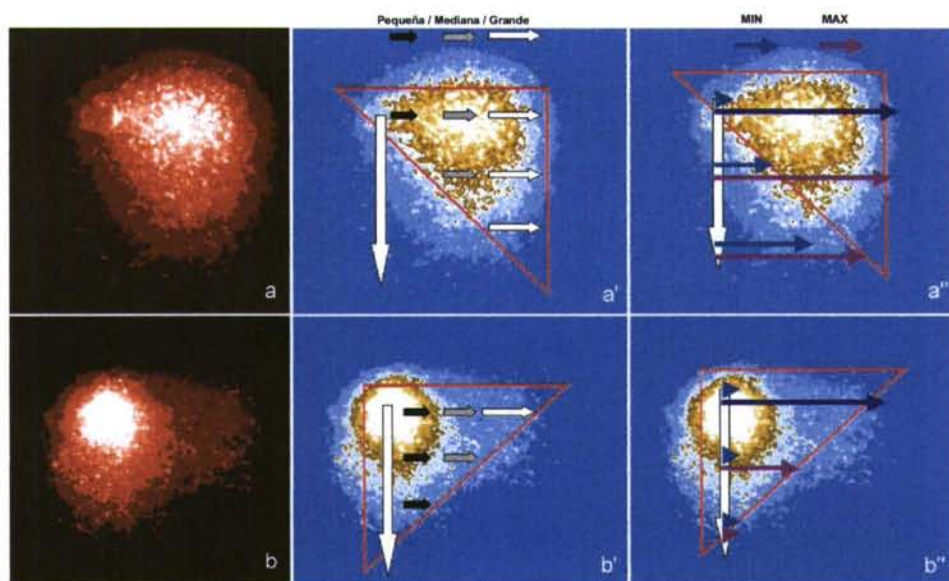
<sup>b</sup> la longitud de migración se midió desde el eje longitudinal central del primer cometa (ver figura 20 a'' y b'').

<sup>c</sup> Incluye el área que contiene el ADN migrado en la segunda electroforesis y se representa en nivel de gris/10<sup>6</sup>.

<sup>d</sup> no aumento detectable en el número de pixels.

	0Gy	13Gy	39Gy
<b>Primera electroforesis<sup>a</sup></b> <i>Longitud migración (máx.)</i>	85,45±5,62	144,82±11,17	177,52±16,54
<b>Segunda Electroforesis<sup>b</sup> Alcalina</b> <i>Longitud migración</i>			
Desde cabeza			
mín.	0 <sup>d</sup>	0	0
máx.	181,38±12,80	196,50±10,08	227,95±12,99
Desde mitad de cola			
mín.	0	30,77±7,06	40,33±5,97
máx.	0	191,09±10,25	220,15±9,90
Desde extremo de cola			
mín.	0	113,23±14,09	128,50±24,87
máx.	0	171,36±18,70	183,65±14,52
<b>Segunda Electroforesis<sup>b</sup> Neutra</b> <i>Longitud migración</i>			
Desde cabeza			
mín.	0	0	0
máx.	56,00±8,56	200,38±13,41	205,00±18,96
Desde mitad de cola			
mín.	0	0	0
máx.	0	60,00±10,67	72,30±9,61
Desde extremo de cola			
mín.	0	0	0
máx.	0	0	0
<b>Segunda Electroforesis<sup>b</sup> Alcalina</b> <i>Intensidad Total Fluorescencia<sup>c</sup></i>	16,84±3,70	28,74±7,17	51,05±10,64
<b>Segunda Electroforesis<sup>b</sup> Neutra</b> <i>Intensidad Total Fluorescencia<sup>c</sup></i>	0,33±0,16	1,31±0,28	2,99±1,40

Las imágenes obtenidas en el experimento 2 (Electroforesis neutra – unwinding –90° Electroforesis neutra) están representadas en la Figura 19 a'-c'. A medida que la dosis de rayos X aumenta, más ADN de cadena sencilla migra en la segunda electroforesis. La migración del ADN de la cabeza en el cometa inicial es heterogénea, al igual que en la electroforesis alcalina, con ADN con movilidad grande, mediana y pequeña (Fig. 19c' y Fig. 20b, b', b'', tabla 5). En la mitad de la cola, la migración es menos heterogénea, con ADN de movilidad mediana y pequeña, mientras que en el extremo de la cola sólo encontramos ADN sin movilizar. En este caso obtenemos un resultado opuesto al observado cuando la segunda electroforesis se realizaba bajo condiciones alcalinas. La movilización de ADNcs tras la segunda electroforesis neutra, 90° con respecto a la anterior, es progresivamente menor. En el caso de la segunda electroforesis neutra, las condiciones de pH permiten la renaturalización parcial del ADNcs generado durante el paso previo de desnaturalización. Por lo tanto, parece que bajo estas condiciones, los fragmentos de ADNcs se entrelazarían, resultando en una menor libertad de migración. En la cabeza del cometa inicial, el grado de entrelazamiento del ADNcs no parece ser tan fuerte como para prevenir su movilización durante la segunda electroforesis, al menos en una parte del ADN. Sin embargo, según nos vamos hacia la cola, el grado de entrelazamiento parece ser mayor, impidiendo la migración (tabla 5).



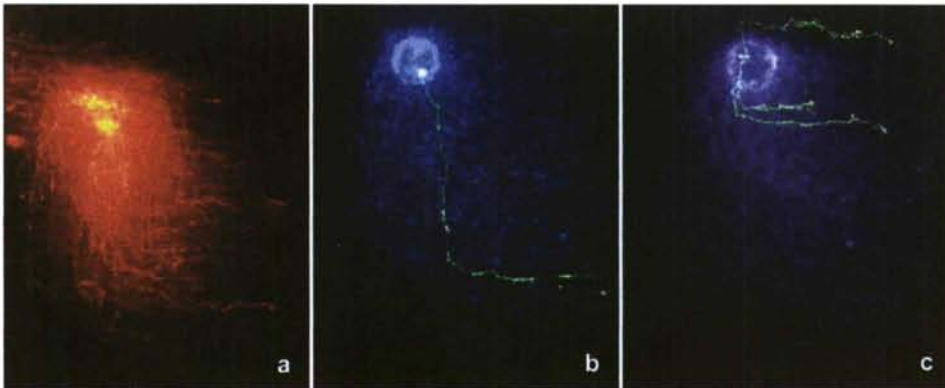
**Figura 20.** Ejemplos de imágenes de DBD-FISH con sonda para el genoma global, en cometas bidimensionales, donde la primera electroforesis neutra fue de arriba abajo, y tras el unwinding alcalino, la segunda electroforesis se realizó de izquierda a derecha, bajo condiciones alcalinas (a, a', a'') o neutras (b, b', b''). a', a'' y b', b'' son figuras esquemáticas para ilustrar el análisis. La flecha larga, (de arriba abajo), representa la primera electroforesis neutra, a' y b': la migración del ADN en la segunda electroforesis, a 90° de la primera, está indicada como pequeña (flechas negras), mediana (flechas grises) o alta (flechas blancas). La migración del ADN en la segunda electroforesis alcalina (a') es progresivamente mas homogénea en el rango de movilidad alta desde la cabeza al extremo de la cola del cometa inicial, mientras que es progresivamente menor cuando se realizó la segunda electroforesis neutra (b'). las longitudes de migración mínimas y máximas en la segunda electroforesis se midieron desde tres puntos del eje longitudinal central del primer cometa: en el centro de la cabeza, en el medio de la cola, y en el extremo de la cola (a'' y b''). Estas figuras son solo para ilustración y no representan medidas reales.

### *Modelo de migración en electroforesis bidimensional del ADN sin desnaturalizar*

Inmediatamente después de la primera electroforesis neutra, el cometa resultante fue sometido a una segunda electroforesis, 90° con relación a la primera, también neutra, pero sin el paso intermedio de desnaturalización (experimento 3). El ADN es movilizado sin ninguna desnaturalización, en su conformación de doble cadena. En este caso, los cometas bidimensionales parecen estar formados por fibras de ADN (Fig. 21) mas que por puntos (o “spots”), y durante la segunda electroforesis el ADN de la cabeza del cometa inicial no migra. Este resultado es bastante diferente del obtenido cuando la segunda electroforesis se realizó con el ADN desnaturalizado. Klaude et al., (1996) no detectaron reorientación del ADN desde la cola después de realizar una electroforesis neutra a 90° de la primera, sin embargo nosotros sí obtuvimos una movilización clara tras la segunda electroforesis. De forma que moviéndonos desde la cabeza a la cola del

cometa inicial, la distancia de migración de las fibras aumentó en la segunda electroforesis (Fig. 21a). Esto puede ser debido a que las fibras presentan una mayor flexibilidad y capacidad de ser movilizadas por la segunda electroforesis. Además, las fibras tienden a doblarse en ángulos rectos desde un punto variable de la cola. Esto se pudo observar al hibridar tanto con sonda para el genoma global (Fig. 21a) como con una sonda específica de la secuencia alfoide centromérica del cromosoma X (locus DXZ1; Fig. 21b y c). La apariencia multirramificada tras la hibridación con DXZ1, observada en la figura 3c, refleja probablemente la organización de este locus en tres bucles de ADN que no se rompieron durante la electroforesis. Interpretamos estos patrones como indicadores de que la primera migración, bajo condiciones neutras, empieza con la inserción del extremo de un bucle de cromatina dentro de un poro de la matriz de agarosa semi-sólida, empujando y produciendo fibras de cromatina longitudinales en la dirección del ánodo (Sigh y Stephens, 1997). El extremo de la fibra está adaptándose continuamente y eligiendo un poro de la matriz de agarosa en la dirección del campo eléctrico, y formando un camino como un tubo semirrígido, a través del cual fluye el resto de la fibra. La segunda electroforesis, 90° respecto a la primera, empuja la fibra elongada hacia los pequeños poros perpendiculares adyacentes, pero la fibra solamente puede entrar y avanzar a través del poro situado en el extremo de dicha fibra. A través de este extremo, la fibra se dirige en dirección perpendicular. Durante la electroforesis, se irían desenrollando las fibras desde su origen en la cabeza del cometa, siendo guiadas a través de poros rígidos, como si fuera una cuerda dentro de un tubo, y doblándose en el punto donde el extremo de la cola se introdujo en el poro perpendicular. El punto de flexión en ángulo recto probablemente refleja el lugar donde el extremo de la fibra estaba localizado cuando se movió en dirección perpendicular.





**Figura 21.** Cometas bidimensionales en leucocitos sanguíneos humanos sin irradiar, realizando primero una electroforesis bajo condiciones neutras (de arriba abajo), y después otra electroforesis a  $90^\circ$  (de izquierda a derecha), bajo las mismas condiciones neutras. A medida que las fibras se localizan hacia el extremo del primer cometa, éstas parecen comportarse más libres para ser movilizadas por la segunda electroforesis a  $90^\circ$ . a: el ADN se desnaturizó completamente y se hibridó con sonda para el genoma total (rojo). Las fibras de ADN parecen migrar libremente en la segunda electroforesis, pues se localizan en el extremo de la cola del cometa inicial. b y c: cometas hibridados con sonda para el locus DXZ1 aloide (verde). El ADN se contratiñó con DAPI (azul). Apuntar que la fibra de DXZ1 extendida tiende a doblarse en ángulo recto.

El análisis simultáneo de ssbs y dsbs en ADN de células aisladas, ha sido referido anteriormente mediante la utilización de DBD-FISH sobre cometas neutros. En este estudio, empleando electroforesis en dos dimensiones, el modelo de migración desde la primera electroforesis, bajo condiciones neutras, debería estar relacionado con las dsbs, mientras que el patrón de migración de la segunda electroforesis, bajo condiciones alcalinas o tras una desnaturalización alcalina parcial, debería reflejar principalmente las ssbs y los lugares lábiles alcalinos que se pueden originar debido a la irradiación ionizante (Olive, 1999). Para cuantificar simultáneamente las dsbs y ssbs en la misma célula, es necesario que ambos tipos de migración aumenten linealmente con la dosis. La cuantificación simultánea de ssb y dsb podría efectuarse empleando agentes que inducen estas lesiones exclusivamente, o mediante el uso de células mutantes con daño en la reparación de ssb o dsb (Fernández et al., 2001a). Además, el empleo del DBD-FISH podría servir para analizar estos parámetros no sólo en el genoma global, sino también en secuencias de ADN específicas, de modo que se podría evaluar la posible heterogeneidad intragenómica en cuanto a daño y reparación del ADN. El empleo de SCGE en dos dimensiones puede ser una herramienta para el estudio de la distribución y reparación de las lesiones en el ADN a lo largo del genoma, así como para investigar la naturaleza de dicho ensayo.

***“Patterns of DNA migration in Two-dimensional single-cell electrophoresis  
Analyzed by DNA Breakage  
Detection-Fluorescence In Situ  
Hybridization”***

## Brief Communication

### Patterns of DNA Migration in Two-Dimensional Single-Cell Gel Electrophoresis Analyzed by DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization

M.T. Rivero,<sup>1,2</sup> F. Vázquez-Gundín,<sup>1</sup> L. Muriel,<sup>1,2</sup> V. Goyanes,<sup>2</sup> J. Gosálvez,<sup>3</sup>  
and J.L. Fernández<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, La Coruña, Spain

<sup>2</sup>Sección de Genética y Unidad de Investigación, Hospital Teresa Herrera, Complejo Hospitalario Juan Canalejo, La Coruña, Spain

<sup>3</sup>Unidad de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

---

**Key words:** DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH); single-cell gel electrophoresis; two-dimensional electrophoresis; DNA migration.

---

The single-cell gel electrophoresis (SCGE) or comet assay is a well-established procedure for quantifying DNA breakage and repair in single cells [Olive, 1999; Tice et al., 2000]. Nucleoids obtained after cell lysis of agarose-embedded cells are electrophoresed under alkaline or neutral conditions, and after staining DNA with a fluorescent dye, give the appearance of a comet with a head and a tail. DNA breaks increase the migration length and/or the amount of DNA in the tail. Not only DNA breaks, but also other types of lesions can be assessed, either as increases in migration, e.g., alkali-labile sites at alkaline pH, or as decreases in migration, e.g., DNA-DNA cross-links.

Although widely used, there is no clear understanding of the electrophoretic behavior of the DNA in SCGE. In this communication we have performed neutral and alkaline electrophoresis sequentially on the same cell (i.e., a right-angled, bidimensional SCGE) to obtain information about the mechanisms of DNA migration. SCGE DNA patterns were evaluated using conventional fluorescence in situ hybridization (FISH) or DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH) [Fernández and Gosálvez, 2002], since the hybridization signals result in a very sensitive delineation of DNA molecules.

The study was carried out on human peripheral blood leukocytes, which were mixed with low-melting-point agarose to give an agarose concentration of 0.7%. The mix was pipetted onto a glass slide covered with a thin film of 0.65% standard agarose dried at 80°C and was covered with a glass coverslip. After the agarose solidified, the slide was exposed on ice to x-rays, by administering 0, 13, 26, and 39 Gy in transverse strips on the same slide. The slides were incubated sequentially for 30 min each in two lysing solutions, both at 22°C: 0.4 M Tris-HCl, 0.8 M dithiothreitol (DTT),

1% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 7.5, followed by 0.4 M Tris-HCl, 2 M NaCl, 1% SDS, 0.05 M EDTA, pH 7.5. The first solution is sufficient for cell lysis; when both solutions are used separately, the first solution has a more pronounced effect than the second, even for spermatozoa. However, we have observed that using the two solutions sequentially increases the quality and sharpness of the chromatin and produces a better discrimination of the head of the comet. The slides then were washed extensively with TBE buffer (0.09 M Tris-borate, 0.002 M EDTA, pH 7.5), transferred to an electrophoresis chamber, and electrophoresed at 20 V (1 V/cm), 12 mA, 12.5 min, at 22°C in TBE buffer (first-run neutral electrophoresis of nondenatured DNA). After a wash in 0.9% NaCl, the slides were incubated at 22°C for 2.5 min in an alkaline unwinding solution (0.03 M NaOH, 1 M NaCl, pH 12.2) to generate single-stranded DNA (ssDNA) starting from the ends of DNA breaks. Next, the slides were washed extensively with 0.9% NaCl and were oriented 90° to the first electrophoresis for a

---

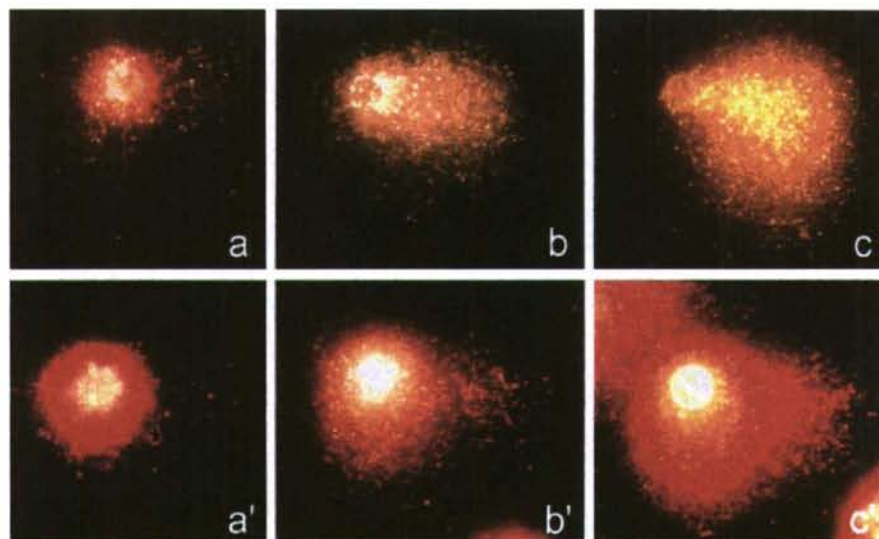
Grant sponsor: European Atomic Energy Community (Fifth Framework Program); Grant number: FIGH-CT-2002-00217 (TELOSENS); Grant sponsor: Consejo de Seguridad Nuclear (CSN); Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias; Grant number: FIS, 01-3113; Grant sponsor: Xunta de Galicia; Grant number: PGIDIT03PXIC91603PN; PGIDIT03PXIC91603PN.

\*Correspondence to: José Luis Fernández, Centro Oncológico de Galicia, Avda de Montserrat s/n, 15009 La Coruña, Spain. E-mail: genetica@cog.es

Received 21 February 2003; provisionally accepted 24 May 2003; and in final form 26 June 2003

DOI 10.1002/em.10187





**Fig. 1.** DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH) signals after hybridization with a whole genome probe (green) on two-dimensional comets obtained from human blood leukocytes exposed to 0 (**a,a'**), 13 (**b,b'**), and 39 (**c,c'**) Gy of x-rays. After the first neutral

electrophoresis (from upper to lower), the initial comet was briefly unwound, and then electrophoresed from left to right under alkaline (**a,b,c**) or neutral (**a',b',c'**) conditions.

second electrophoresis of 4 min at 20 V (1 V/cm), 85 mA, 22°C, in 0.03 M NaOH (pH 12.2) (second-run alkaline electrophoresis of partially denatured DNA; i.e., Experiment 1). The slides were then neutralized, washed, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, and air-dried. ssDNA generated by the alkali was detected by hybridization with a whole-genome probe following the DBD-FISH procedure [Fernández and Gosálvez, 2002]. In Experiment 2, after the first neutral electrophoresis and the alkaline unwinding incubation, the slides were washed extensively with TBE buffer and subjected to a second electrophoresis of 4 min, with the slides oriented 90° to the direction of the first run, at 20 V (1 V/cm), 12 mA, 22°C, in TBE buffer (second-run neutral electrophoresis of partially denatured DNA). Finally, in Experiment 3, this same second neutral electrophoresis was performed immediately after the first neutral electrophoresis, without the alkaline unwinding step. In this case, after dehydration, the DNA was denatured in 50% ethanol containing 0.1 M NaOH for 2.5 min and hybridized.

Images were acquired using a high-sensitivity CCD camera (UltrapiX 1600, Astrocam, Perkin-Elmer Optoelectronics, Wiesbaden, Germany), which detects >16,000 gray levels and permits subtraction of the current dark image and correction for nonuniform sample illumination. Image analysis was performed using a semiautomatic routine designed with Visilog 5.1 software (Noesis, Orsay, France). This allows for setting thresholds and background subtraction and measures the whole fluorescence intensity of the signal.

Figure 1a–c shows images obtained when alkaline elec-

trophoresis was performed at 90° to the preceding run, after a brief unwinding step (Experiment 1). Irradiation promotes greater DNA migration during the first electrophoresis (Table I), the amount of DNA decreasing progressively from the head to the tip of the tail of the initial comet. In this first neutral run, the DNA migrates entirely in a double-stranded conformation. The alkaline denaturation during the unwinding and electrophoretic steps produces ssDNA starting from the ends of the breaks, so more ssDNA is produced as the dose increases. At the macromolecular level, the local concentration of radical scavengers and different chromatin structures may influence the distribution of ionizing-radiation-induced damage [Vázquez-Gundín et al., 2002]. However, from a practical standpoint, damage can be considered to be randomly distributed when working with whole nucleus. At this relatively gross level, the differences in DNA damage among small chromatin regions are assumed to be negligible in comparison with the overall damage to the genome, so the areas of higher DNA concentration should contain a greater amount of damage. Thus, alkaline denaturation during the unwinding and electrophoretic steps produces more ssDNA in the head than in the tail, yielding a more intense labeling of the DNA that migrates from the head as the result of the perpendicular second run.

Examining the DNA migration pattern that results from the second 90° alkaline electrophoresis, it is evident that the migration of DNA from the head of the comet generated by the first run is heterogeneous, with a continuum of high-, medium- and low-mobility DNA (Figs. 1c and 2a,a',a'');



**TABLE I. Quantitative Dose-Response Data (Mean  $\pm$  Standard Deviation) From DBD-FISH With a Whole Genome Probe and Two-Dimensional SCGE**

	0 Gy	13 Gy	39 Gy
First electrophoresis <sup>a</sup>			
Migration length (max)	85.45 $\pm$ 5.62	144.82 $\pm$ 11.17	177.52 $\pm$ 16.54
Second electrophoresis <sup>b</sup>			
Alkaline			
Migration length (pixels)			
From head			
min	0 <sup>d</sup>	0	0
max	181.38 $\pm$ 12.80	196.50 $\pm$ 10.08	227.95 $\pm$ 12.99
From middle of the tail			
min	0	30.77 $\pm$ 7.06	40.33 $\pm$ 5.97
max	0	191.09 $\pm$ 10.25	220.15 $\pm$ 9.90
From tip of the tail			
min	0	113.23 $\pm$ 14.09	128.50 $\pm$ 24.87
max	0	171.36 $\pm$ 18.70	183.65 $\pm$ 14.52
Second electrophoresis <sup>b</sup>			
Neutral			
Migration length (pixels)			
From head			
min	0	0	0
max	56.00 $\pm$ 8.56	200.38 $\pm$ 13.41	205.00 $\pm$ 18.96
From middle of the tail			
min	0	0	0
max	0	60.00 $\pm$ 10.67	72.30 $\pm$ 9.61
From tip of the tail			
min	0	0	0
max	0	0	0
Second electrophoresis <sup>b</sup>			
Alkaline	16.84 $\pm$ 3.70	28.74 $\pm$ 7.17	51.05 $\pm$ 10.64
Whole fluorescence intensity <sup>c</sup>			
Second electrophoresis <sup>b</sup>			
Neutral			
Whole fluorescence intensity <sup>c</sup>	0.33 $\pm$ 0.16	1.31 $\pm$ 0.28	2.99 $\pm$ 1.40

SCGE, single-cell gel electrophoresis; DBD-FISH, DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization.

<sup>a</sup>A total of 45 cells were analyzed per experimental point. Except for comets having no migration (0) and the maximum migration length from the head for 13 and 39 Gy in the case of the second neutral electrophoresis, all data were statistically significant with dose (Student's *t*-test, *P* < 0.05, with appropriate adjustments made for multiple comparisons).

<sup>b</sup>Measurements were made from the center of the head.

<sup>c</sup>Migration length is measured from the central longitudinal axis of the first comet (see Fig. 2a" and b").

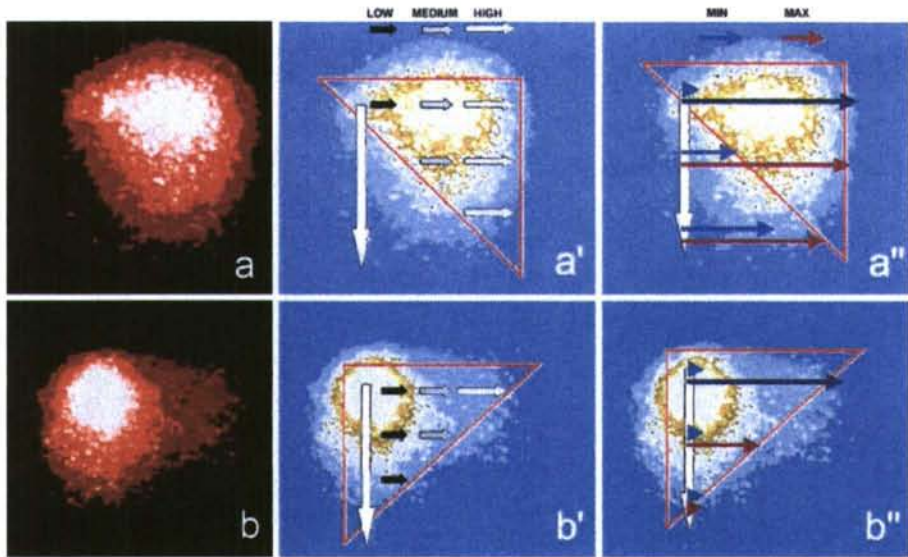
<sup>d</sup>Includes the surface area containing DNA migrated in the 90° run and is in whole gray level/10°.

<sup>e</sup>No detectable increase in pixel number.

Table I). In the middle of the initial comet tail, the migration is less heterogeneous, with high- and medium-mobility DNA. Finally, at the tip of the tail, the migration is homogeneous, with only high-mobility DNA, so that there is no labeling at the original tail position. Thus, the migration of ssDNA by the 90° alkaline electrophoresis is progressively more homogeneous, moving from the head to the tail of the comet obtained from the first electrophoresis. During the second alkaline electrophoresis, the length of ssDNA increases with time, and these ssDNA motifs presumably do not interact with each other due to the denaturing conditions. Since the amount of DNA decreases progressively from the head to the tip of the tail of the initial comet, there is progressively less ssDNA from the head to the tail, so this ssDNA may be less entangled, and thereby increasingly free to migrate during the second electrophoresis. This is re-

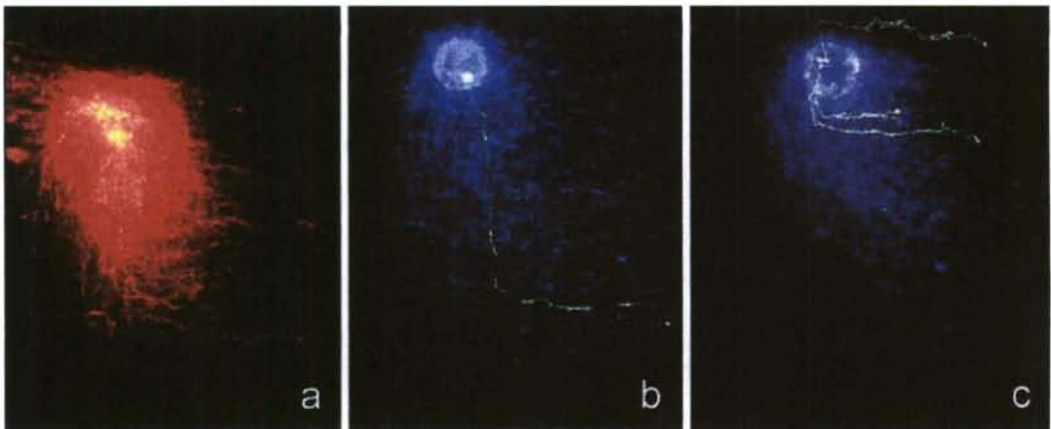
flected in the Whole Fluorescence Intensity measurements of the area containing migrated DNA (Table I).

The images obtained when the initial neutral comets were subjected to a neutral 90° second run after a brief unwinding step (Experiment 2) are presented in Figure 1(a'–c'). As the dose of x-rays increases, more ssDNA migrates in the second run. The DNA migrating from the head of the initial comet is heterogeneous, as in the alkaline run, with high-mobility, medium-mobility, and unmobilized DNA seen (Fig. 1c'; Fig. 2b,b', b"; Table I). At the center of the tail, the migration is less heterogeneous, with medium-mobility and un-mobilized DNA apparent, whereas there is no DNA migration from the tip of the tail. Thus, moving from the head to the tip of the tail of the comet resulting from the first electrophoresis, there is progressively less mobilization of ssDNA by the 90° neutral electrophoresis. This is opposite



**Fig. 2.** Examples of images from DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH) with the whole genome probe, on bidimensional comets, where the first neutral electrophoresis was from upper to lower, and after alkaline unwinding, the second electrophoresis was performed from left to right, under alkaline (a,a',a'') or neutral (b,b',b'') conditions. a',a'' and b',b'' are schematic figures to illustrate features of the analysis. The long arrow, (from upper to lower), represents the first neutral electrophoresis. a' and b': The DNA migration in the 90° second run is indicated as low (black arrows), medium (gray arrows) or

high (white arrows). The migration of ssDNA by the 90° alkaline run (a') is progressively more homogeneous in the high-mobility range from the head to the tip of the tail of the initial comet, whereas it is progressively lower when the 90° run was neutral (b'). The minimum and maximum migration lengths in the second run were measured from three points at the central longitudinal axis of the first comet: at the center of the head, at the middle of the tail, and at the tip of the tail (a'' and b''). These figures are only for illustration and do not depict actual measurements.



**Fig. 3.** Two-dimensional comets from unirradiated human blood leukocytes first electrophoresed under neutral conditions (from upper to lower) and then 90° electrophoresed (from left to right), under the same neutral conditions. a: following electrophoresis, DNA was completely denatured and hybridized with a whole genome probe (red). DNA fibers appear free

to migrate by the 90° run as they were located at the tip of the tail of the initial comet. b,c: Comets were hybridized with a centromeric alphoid DXZ1 locus probe (green). DNA was DAPI counterstained (blue). Note that the extended DXZ1 fibers tend to bend at right angles.



to the result obtained when the second 90° run was performed under alkaline conditions. In the case of the 90° neutral run, the neutral conditions may allow the partial renaturation of the ssDNA generated during the alkaline unwinding step. It appears as if ssDNA motifs entangle under these conditions, being less free to migrate. In the head of the initial comet, the degree of ssDNA entanglement does not appear to be strong enough to prevent mobilization by the second run, at least for a fraction of the DNA. Moving farther into the tail, however, the degree of entanglement seems to be greater, hindering DNA migration (Table I).

In Experiment 3, the DNA remained in its double-stranded conformation. In this case, bidimensional comets appear to consist of DNA fibers (Fig. 3) rather than spots, and DNA from the head of the initial comet did not migrate during the second electrophoresis, a quite different result from that obtained when this 90° run was performed on denatured DNA. Very high doses of x-rays (e.g., 52 Gy) were necessary to produce fibers extending from the head (data not shown). Unlike the results of Klaude et al. [1996], who did not detect reorientation of the DNA from the tails after a second neutral electrophoresis at 90° to the first, we obtained a clear reorientation with the second run. Thus, moving from the head to the tail of the initial comet, the migration distance of the fibers increased in the second run (Fig. 3a), i.e., the fibers displayed higher flexibility and capacity to be mobilized by the second run. Moreover, the fibers tended to bend at right angles from a variable point in the tail. This was demonstrated using both a whole genome probe (Fig. 3a) as well as a specific probe that hybridizes to centromeric alphoid sequences of the X chromosome (DXZ1 locus; Fig. 3b,c). The multibranched appearance of DXZ1 hybridization in Figure 3c probably reflects the organization of this locus in three DNA loops that were not disrupted during the electrophoresis as in Figure 3b. We interpret these patterns as indicating that the first migration under neutral conditions starts with the insertion of the tip of a loop or chromatin fiber into a pore of the semi-solid agarose matrix, pulling and producing longitudinally electrostretched chromatin fibers in the direction of the anode [Singh and Stephens, 1997]. The end of the fiber is continuously adapting and choosing a pore of the agarose matrix in the direction of the electric field, going forward by fits and starts, and sculpting a pathway like a semi-rigid tube through which the rest of the fiber flows. The subsequent 90° electrophoresis pulls the elongated fiber into adjacent small perpendicular pores, but the fiber can enter and advance through one of these pores only at its terminus. Then, the fiber is pulled in the perpendicular direction, with its tip leading. As the electrophoresis progresses, additional fiber may be unfolded from its origin in the head of the comet, being guided through the rigid pores like a string in a tube, and bending at the point where the tip has been introduced into the perpendicular pore. Therefore, the right-angle bending point probably reflects the place where the tip of the fiber was located when it moved in the perpendicular direction.

A simultaneous analysis of radiation-induced DNA sin-

gle-strand breaks (ssb) and double-strand breaks (dsb) in single cells has been reported using DBD-FISH on neutral comets [Fernández et al., 2001]. In the present study, using two-dimensional electrophoresis, the migration patterns from the first run, under neutral conditions, should be related to the dsb yield, whereas the migration patterns from the second run, performed under alkaline or after a partial alkaline unwinding, should mainly reflect the ssb and alkali-labile sites that may be produced, for instance, by exposure to ionizing radiation [Olive, 1999]. To quantify dsb and ssb simultaneously in the same cell, it is necessary for both migration patterns to have a linear increase with dose. Then, manipulation of the denaturation level should reveal the amount of ssDNA mobilized by the second run, adapted to produce a linear increase in the mobilization parameters over the specific range of doses used in the experiment. Demonstrating the simultaneous quantification of ssb and dsb could be accomplished using agents that induce these lesions exclusively, or using mutant cells with impaired ssb or dsb repair [Fernández et al., 2001]. Moreover, the use of DBD-FISH should be able to analyze these parameters not only in the whole genome, but also in specific DNA sequences, thus evaluating possible intragenomic heterogeneity in DNA damage and repair. We propose using two-dimensional SCGE methodologies as a tool for studying the distribution and repair of DNA lesions along the genome, as well as for investigating mechanistic aspects of the SCGE assay.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Phil Mason for editorial suggestions.

## REFERENCES

- Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT, Genescà A, Gosálvez J, Goyanes V. 2001. DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of single- and double-strand breaks in individual cells. *Exp Cell Res* 270:102–109.
- Fernández JL, Gosálvez J. 2002. Application of FISH to detect DNA damage: DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol* 203:203–216.
- Klaude M, Eriksson S, Nygre J, Ahnström G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Res* 363:89–96.
- Olive PL. 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 75:395–405.
- Singh NP, Stephens RE. 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Res* 383:167–175.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221.
- Vázquez-Gundín F, Rivero MT, Fernández JL. 2002. Radiation-induced DNA breaks in different human satellite DNA sequence areas, analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Radiat Res* 157: 711–720.

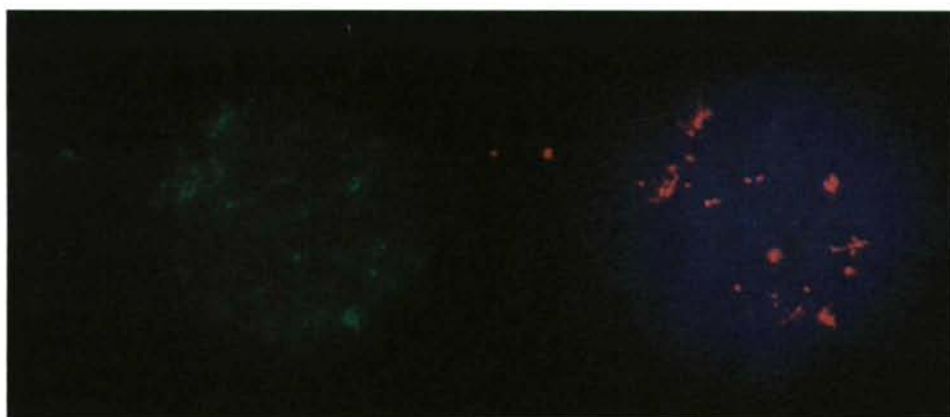
Accepted by—  
A. D. Kligerman

***4. Diferencias en los patrones de  
reparación de las secuencias  
teloméricas intersticiales en células  
de hámster chino normales y  
deficientes en la reparación de  
roturas de cadena doble del ADN***



*Señal basal en DBD-FISH y estructura de las ITRS (secuencias teloméricas intersticiales).*

En estos experimentos, se procesaron mediante DBD-FISH las líneas celulares de hámster chino intactas, realizando la hibridación con sonda para el genoma total. En la figura 22 se representa la señal basal obtenida empleando condiciones de desnaturalización alcalina muy restrictivas (NaOH 0,03M, 7°C, 2,5min), que teóricamente generaría pequeños tramos de ADNcs a partir de los extremos de las roturas basales y de los lugares lábiles alcalinos. Se pone en evidencia que la señal basal de DBD-FISH no se distribuye de forma homogénea en el nucleóide, presentándose áreas con fuerte marcaje basal en los mismos. Se realizó entonces una hibridación simultánea con sonda para el telómero, y se vió que las áreas que se marcaban fuertemente con la sonda de genoma total co-hibridaban con la sonda de telómero, revelando que el álcali genera una mayor cantidad de ADNcs en las ITRS (Fig. 22). Esta observación nos sugiere que dentro del genoma de las células de hámster chino, las ITRS presentan el mayor nivel de sensibilidad al álcali. Esto es algo inesperado debido a que las secuencias teloméricas se consideran ricas en GC en relación con el resto del genoma y no se espera que se desnaturalicen fácilmente. Debería haber alguna modificación en el ADN nativo de las ITRS que hace que sea muy sensible al álcali.



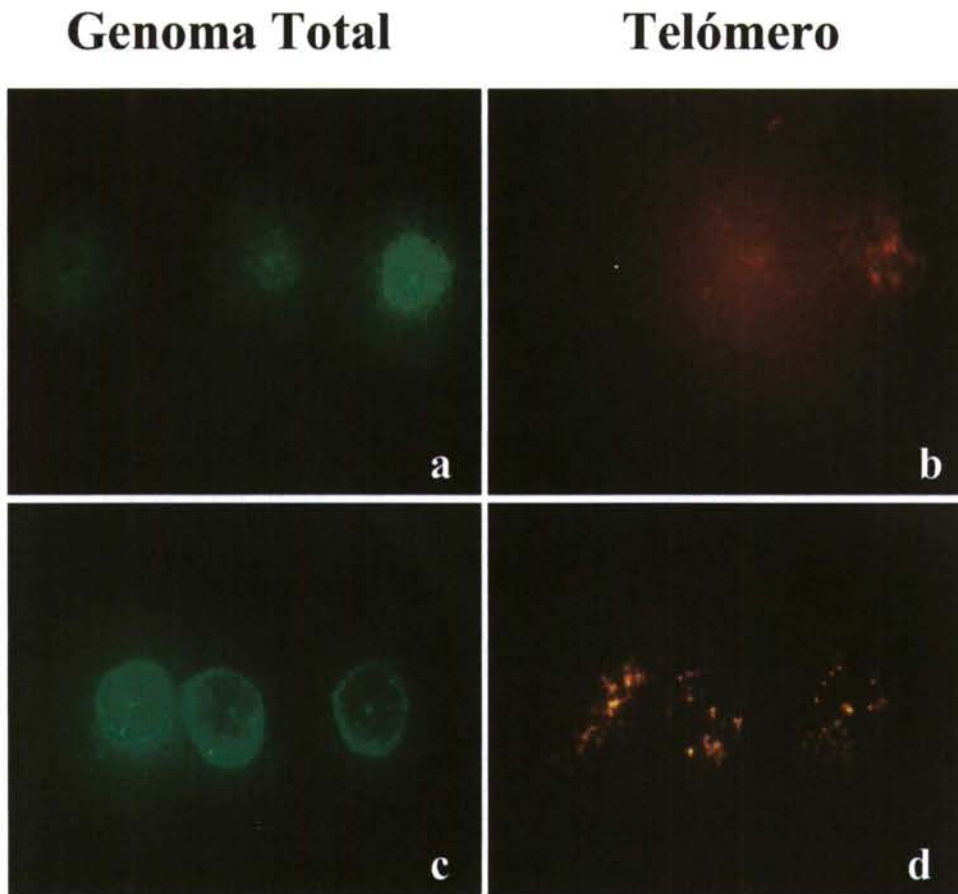
**Figura 22.** Señales basales de DBD-FISH en una célula de hámster chino, tras la hibridación simultánea con sonda para el genoma total (verde, izquierda) y sonda telomérica (rojo, derecha), con contratinción en DAPI (azul). Se observa una co-localización de la señal basal de las ITRS con las zonas de gran intensidad del genoma total, demostrando una extrema sensibilidad de las ITRS a la desnaturalización por el álcali.

Mediante digestión *in situ* con Exonucleasa III se analizó la naturaleza de estos lugares lábiles alcalinos constitutivos en las ITRS (Fig. 23). Esta nucleasa genera tramos de ADNcs a partir de los extremos 3' de la rotura. Además, rompe los lugares abásicos, lugares apúricos o apirimidínicos (AP), produciendo también ADNcs que se amplía a partir de estos lugares (Liu et al., 2002). Se sabe que el álcali también transforma estos lugares AP en roturas de ADN, de modo que son los lugares lábiles alcalinos (Teoule, 1987; von Sonntag, 1987). Este ADNcs generado tras la digestión con la exonucleasa III se puede detectar mediante hibridación con sonda para el genoma total (Gosálvez et al., 2002) (Fig. 23a, b). En este caso, no fue tan evidente la heterogeneidad en el marcaje, sin embargo se detectaron áreas con hibridación ligeramente más fuerte, que se co-localizan con la señal telomérica. Esto significa que los lugares AP contribuyen mínimamente a la sensibilidad al álcali de las ITRS.

Se ha demostrado que el ADN en la cromatina de células mitóticas es más sensible a la desnaturalización que el ADN en la cromatina de células en interfase (Darzynkiewicz et al., 1987; Darzynkiewicz, 1994). Mediante digestión *in situ* con nucleasas específicas de cadena sencilla, como la S1 y la nucleasa mung bean, se ha demostrado que esta sensibilidad se relacionaba con la mayor cantidad de segmentos cortos de ADN sin emparejar, en los cromosomas mitóticos (Juan et al., 1996). Basándose en estas observaciones, se hipotetizó que una fuerza de torsión mayor en los bucles de ADN de los cromosomas mitóticos puede permitir la formación de un elevado número de estructuras en horquilla de cadena simple, que son sensibles a las nucleasas específicas de cadena sencilla. Estos segmentos de ADN sin emparejar son muy pequeños para ser detectados mediante tinción con naranja de acridina o mediante FISH. Sin embargo, se podrían comportar como puntos donde los agentes desnaturalizantes podrían iniciar la generación de ADNcs, que entonces comienza a ser detectado por estos procedimientos. Empleamos nucleasa mung bean para digerir los posibles tramos de ADN sin emparejar presentes en el nucleoide. La incubación secuencial con exonucleasa III transforma los extremos 3'-OH resultantes de la digestión con la nucleasa mung bean en tramos de ADNcs que hibridarán con sondas de ADN. De este modo, el incremento en la señal de hibridación tras la secuencia nucleasa mung bean-exonucleasa III comparado con la exonucleasa III sola, será dependiente del ADNcs extra generado por la exonucleasa III en los segmentos de ADN sin emparejar eliminados por la nucleasa mung bean. Esta incubación secuencial dió como resultado

áreas de fuerte marcaje en el nucleóide con sonda para el genoma total, que se co-localizaban con las señales teloméricas (Fig. 23c, d). Esto sugiere que los bloques de ITRS presentan una estructura cromatínica particular, estando enriquecidas en pequeños segmentos de ADN sin emparejar, que podrían ser la principal razón de su pronunciada sensibilidad al álcali. La constitución de una estructura de la cromatina altamente compactada específicamente en los largos bloques de ITRS puede resultar en una fuerza de torsión mayor que dará lugar a una gran densidad de segmentos de ADN sin emparejar. Dado que el ADNcs es mucho más sensible que el ADN bicatenario a varios tipos de daño (Shapiro 1981; Legault et al., 1997), la elevada densidad de segmentos de ADN sin emparejar podría explicar la frecuencia más alta relativa de daño basal en el ADN y la sensibilidad a la radiación ionizante, en los grandes bloques de ITRS. La constitución de esta estructura cromatínica específica podría ser el factor principal que explique porqué algunas ITRS son sensibles y otras no. Posiblemente, ITRS muy cortas, tanto las constitucionales como las formadas tras la integración por transfección de pequeños plásmidos (Desmaze et al., 1999), pueden no alcanzar la talla crítica o la orientación precisa, para ser organizadas del mismo modo que la estructura cromatínica específica que puede conferir sensibilidad a la rotura y recombinación. Las pequeñas ITRS constitucionales no serían directamente responsables de la fragilidad cromosómica, pero estarían insertadas en regiones frágiles preexistentes (Legault et al., 1997). La orientación de la secuencia telomérica parece jugar un papel esencial en la determinación de la sensibilidad. De este modo, se demostró un incremento dramático en la frecuencia de reordenamientos reasociación de genes cuando secuencias teloméricas de 800 pb se insertaban en ambas orientaciones en el segundo intrón del gen APRT de células de hámster chino, mientras que la inserción en una orientación o en la otra, no dió lugar a rotura y recombinación (Kilburn et al., 2001). Además, se ha demostrado que una ITRS murina teniendo una estructura de repetición invertida fue sensible a la radiación, mientras que una ITRS con una organización de repetición simple en tándem no (Bouffler et al., 1993). Es posible que estas estructuras promuevan una organización cromatínica específica, enriquecida en segmentos de ADN sin emparejar, que pueden conferir fragilidad cromosómica.





**Figura 23.** Células de hámster chino, a las que se les han eliminado las proteínas, digeridas in situ con exonucleasa III (a, b) y con nucleasa mung bean previa a la exonucleasa III (c, d). El ADN de cadena sencilla generado por la exonucleasa III se detectó mediante hibridación simultánea con sonda para el genoma total (verde; a, c) y sonda para el telómero (rojo; b, d). La digestión secuencial con mung bean y con exonucleasa III, da lugar a áreas de fuerte marcaje en el nucleóide con la sonda para el genoma total (c), que se co-localizan con las señales teloméricas (d). Esto sugiere que los bloques de ITRS presentan una estructura particular de la cromatina, enriquecida en pequeños segmentos de ADN sin emparejar.

#### *Sensibilidad a ssb y dsb inducidas por radiación ionizante*

Cuando se realiza una electroforesis neutra sobre los nucleóides, su longitud de migración está relacionada con las dsb. Entonces, el cometa puede ser desnaturalizado en álcali, para transformar las roturas de cadena del ADN y los lugares lábiles alcalinos que se encuentran dispersos sobre el cometa, en pequeños tramos de ADNcs que hibridarán con las sondas de ADN, obteniendo una señal de DBD-FISH. De este modo, la longitud de migración de esta señal debería estar relacionada con las dsb inducidas por la irradiación, mientras que la intensidad de fluorescencia media de la misma señal



sería indicativa de las ssb y de los lugares lábiles alcalinos (Fernández et al., 2001a). Esto se empleó para estudiar las ssb y dsb iniciales inducidas por rayos X, en las ITRS y en el genoma total.

Para establecer una comparación entre ambas dianas, se tuvieron en cuenta tres factores:

Primero, el tamaño de la secuencia así como su respectiva señal basal, son bastante diferentes, de modo que solamente se podrían emplear para comparar sus sensibilidades los valores relativos del incremento en la señal de DBD-FISH en una diana específica, con respecto a la señal basal específica de la misma diana (Vázquez-Gundín et al., 2002).

Segundo, ya que la mayoría de las señales basales en el genoma total dependen de estas ITRS, la curva dosis-respuesta en el genoma global se realizó usando una sonda para el genoma total donde la fuerte señal debida a las ITRS ha sido parcialmente suprimida mediante una incubación previa con exceso de secuencias de ADN telomérico sin marcar (Fig. 24).

Tercero, el álcali podría generar una longitud diferente de ADNcs de una rotura inducida en diferentes dianas, y la tasa de renaturalización puede ser también diferente. Para estimar estas posibles diferencias en la tasa de desnaturalización-renaturalización en las ITRS comparada con la del genoma total, se obtuvieron nucleoides desprovistos de proteínas, realizando un paso lisis. Posteriormente se irradiaron los nucleoides, se realizó la electroforesis, y finalmente la desnaturalización y la hibridación. Ya que la irradiación se realizó en ADN prácticamente desnudo, sin estructuras cromatínicas diferenciales, se puede asumir una inducción de roturas de ADN al azar, a nivel submicroscópico. De este modo, la misma densidad de roturas de ADN, es decir, roturas de ADN por unidad de longitud, se inducirían en las diferentes dianas. Los coeficientes lineales de las curvas de dosis-respuesta reflejan las tasas de desnaturalización-renaturalización (Vázquez-Gundín et al., 2002).

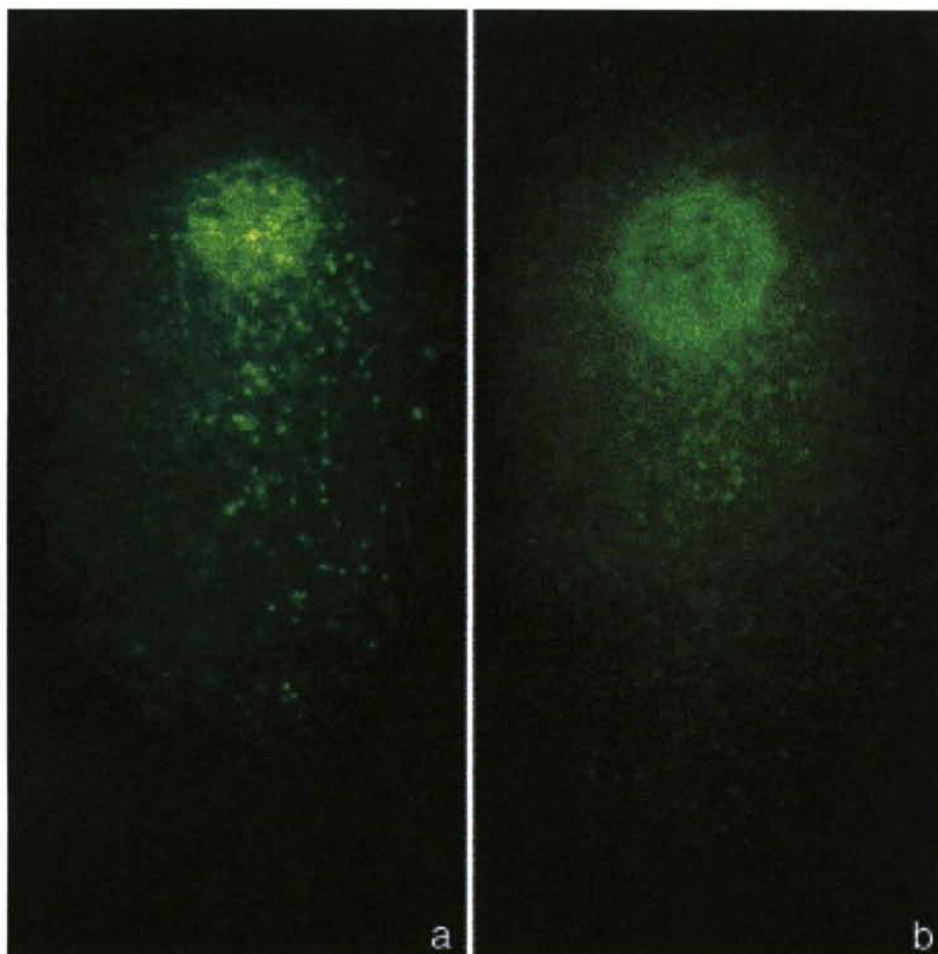
Las curvas dosis-respuesta tras la irradiación de nucleoides de diferentes líneas celulares de hámster chino, y sus coeficientes, se representan en la figura 25 y en la

tabla 6, respectivamente. No hay diferencias evidentes entre las diferentes líneas celulares, y entre los bloques de ITRS y el genoma total, tanto para el incremento relativo en la intensidad media de fluorescencia, es decir ssb, como para el incremento relativo en la longitud de migración, es decir dsb. En consecuencia, la irradiación de nucleoides demostró que las ITRS tienen una tasa similar de desnaturalización-renaturalización y una movilidad eletroforética como las secuencias de ADN del resto del genoma. Esto significa que no se hace necesario un factor de corrección para estos parámetros en la señal de dosis-respuesta resultante tras la irradiación de células nativas.

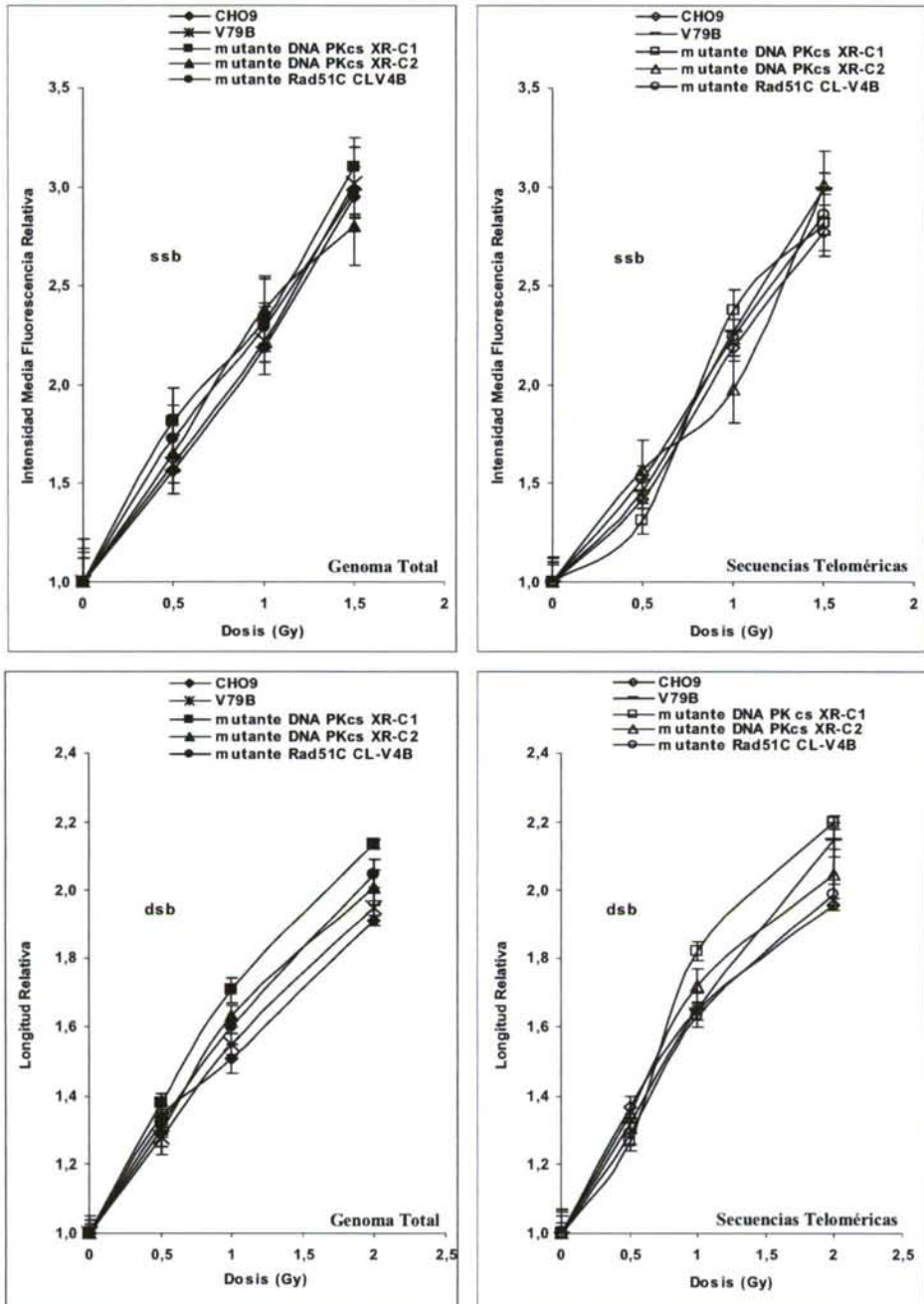
## **DBD-FISH con sonda para el Genoma Total**

**Sin supresión telomérica**

**Con supresión Telomérica**



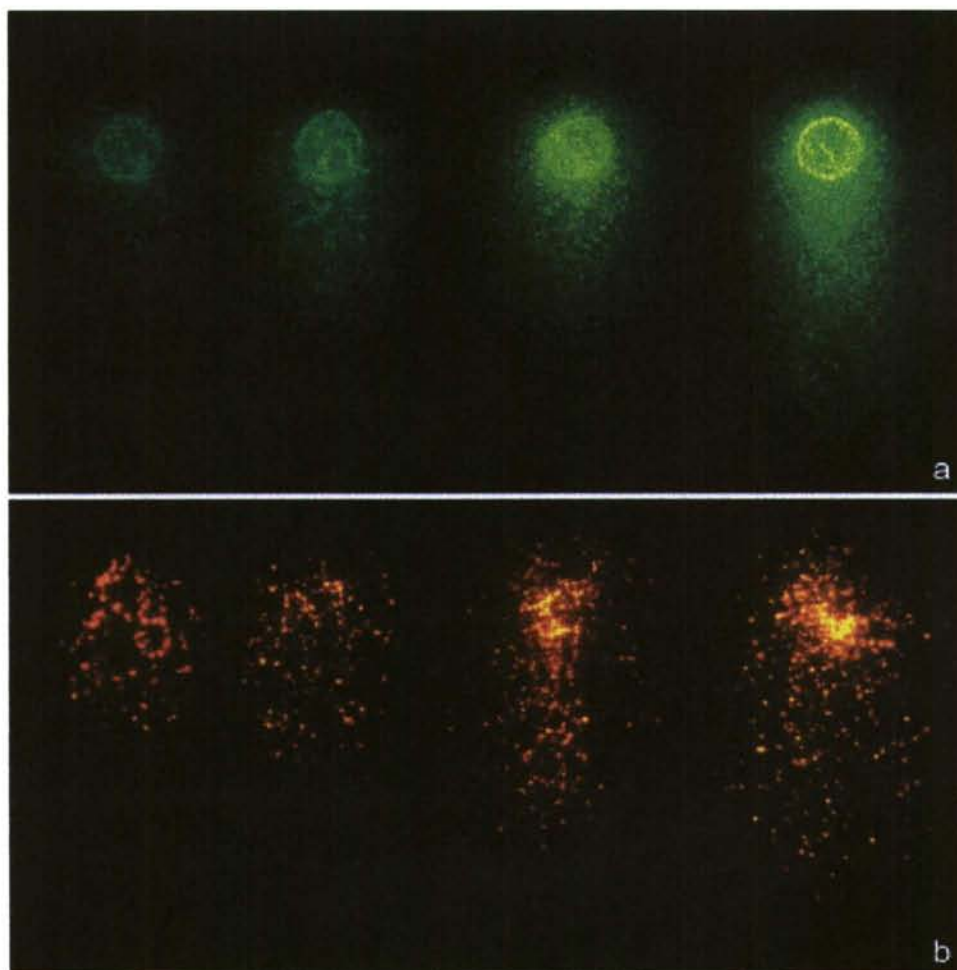
**Figura 24.** DBD-FISH en cometas neutros en células de hámster chino, tras la hibridación con sonda para el genoma total sin (a) y con (b) supresión de la señal procedente de las ITRS.



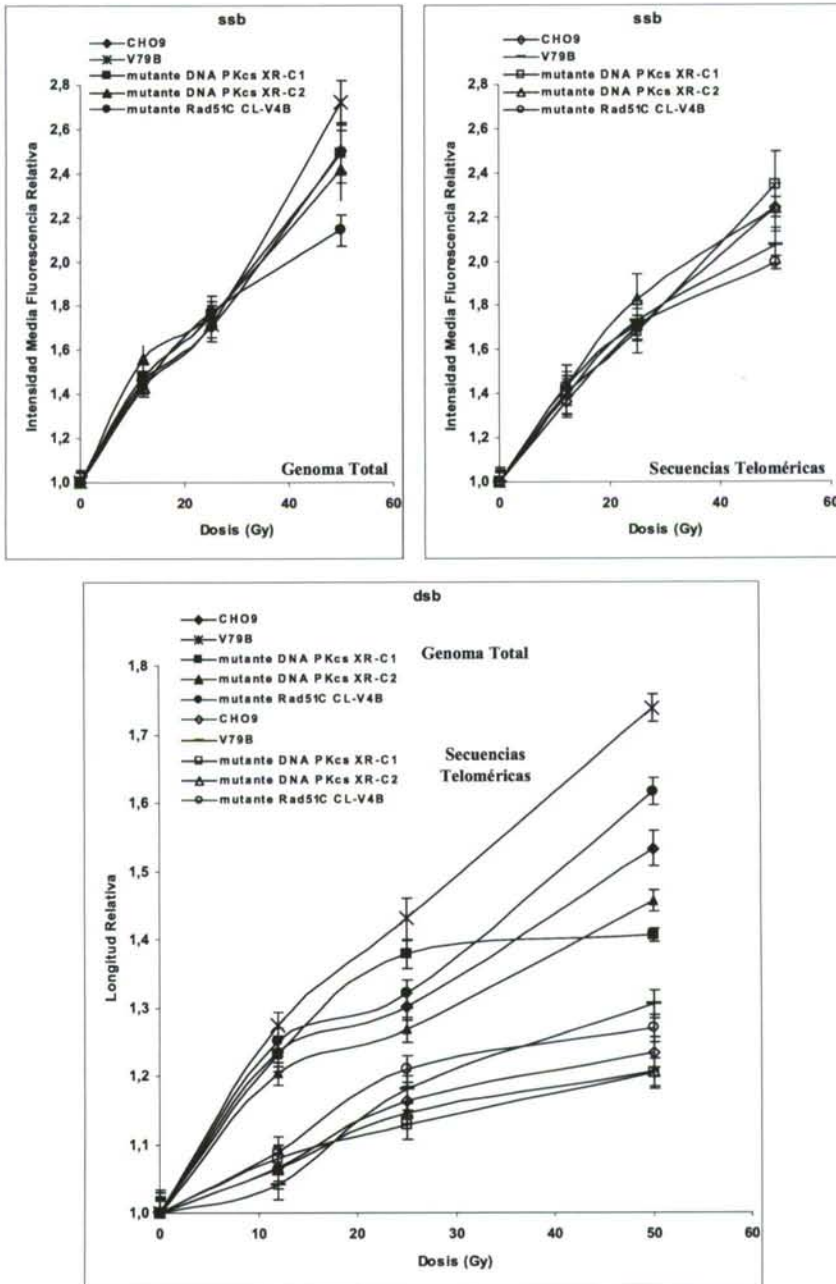
**Figura 25.** Curvas dosis-respuesta para ssb y dsb en el genoma total (símbolos rellenos) y para las ITRS (símbolos vacíos), obtenidas mediante DBD-FISH en cometas neutros tras la irradiación de células de hámster chino desproteinizadas. No se encontraron diferencias significativas entre las ITRS y el genoma total para ambos tipos de daño en el ADN.



Lo siguiente que se realizó fueron las curvas dosis-respuesta tras la exposición a rayos X a las células nativas de las diferentes líneas celulares de hámster chino (Fig. 26 y 27, Tabla 6). De nuevo, no se encontraron diferencias entre las distintas líneas celulares. En relación con las ssb, el incremento relativo en la intensidad media de fluorescencia para las ITRS fue similar al del genoma global. Así, las ssb fueron inducidas con densidad similar tanto en las ITRS como en el genoma total, en una célula intacta. Sin embargo, en el caso del incremento relativo en la longitud de migración, las ITRS fueron menos movilizadas que el genoma total, por un factor de 0,5. De este modo, la movilización electroforética de los bloques de ITRS con la inducción de dsb por irradiación en una célula con su organización cromatínica nativa es la mitad que en el genoma total. Sin embargo, ya que la densidad de ssb inducidas fue similar en ambas dianas, no es probable que la densidad de dsb inducidas sea diferente. Este resultado sugiere que para la misma densidad de dsb, la movilidad electroforética en el ensayo de cometas puede ser diferente en diferentes áreas de secuencias del ADN. Esta movilización diferencial es difícil de explicar ya que no es evidente cuando la irradiación se realiza en nucleoides. Posiblemente podría estar relacionada con el enmarañamiento de las ITRS, que podrían dificultar su migración. Mientras que las ITRS tienden a agruparse en regiones concretas en el núcleo en interfase, siendo susceptibles al enmarañamiento, se dispersan en el nucleóide. La inducción de roturas de ADN en secuencias ITRS esparcidas podría aumentar su relajación en el nucleóide, de modo que podrían migrar tan libres como el genoma total. Sin embargo, en el caso de la irradiación de ITRS agrupadas, podrían permanecer interacciones posibles después de la lisis, conservando un cierto grado de enmarañamiento, o se podrían generar interacciones entre ellos, por ejemplo debido a enlaces cruzados inducidos diferencialmente, siendo menos libres para migrar.



**Figura 26.** Señales representativas de DBD-FISH en cometas neutros, obtenidas tras la irradiación con dosis crecientes de rayos X (0, 15, 25 y 50 Gy, de izquierda a derecha) en el genoma total (verde, a), y en las ITRS (rojo, b), de células de hámster chino.



**Figura 27.** Curvas dosis-respuesta para las ssb y dsb en el genoma total (símbolos rellenos) y en las ITRS (símbolos vacíos), obtenidas mediante DBD-FISH en cometas neutros tras la irradiación de líneas celulares de hámster chino. No se encontraron diferencias significativas entre las ITRS y el genoma total en las ssb. Sin embargo, la longitud de migración relativa (dsb) de las ITRS fue la mitad que en el genoma total.

Nucleoides	Línea celular	GT	ITRS
ssb	CHO9	1,29±0,06	1,22±0,09
	V79B	1,34±0,07	1,36±0,10
	mutante DNA PKcs XR-C1	1,36±0,08	1,31±0,20
	mutante DNA PKcs XR-C2	1,23±0,09	1,29±0,18
	mutante Rad51C CL-V4B	1,30±0,04	1,26±0,05
dsb	CHO9	0,44±0,04	0,47±0,07
	V79B	0,47±0,03	0,57±0,03
	mutante DNA PKcs XR-C1	0,56±0,06	0,62±0,10
	mutante DNA PKcs XR-C2	0,50±0,05	0,52±0,08
	mutante Rad51C CL-V4B	0,52±0,03	0,50±0,05
Células		GT	ITRS
ssb	CHO9	0,029±0,002	0,025±0,001
	V79B	0,034±0,002	0,021±0,003
	mutante DNA PKcs XR-C1	0,029±0,002	0,026±0,001
	mutante DNA PKcs XR-C2	0,027±0,003	0,024±0,003
	mutante Rad51C CL-V4B	0,022±0,003	0,019±0,004
dsb	CHO9	0,010±0,002	0,005±0,001
	V79B	0,014±0,002	0,006±0,001
	mutante DNA PKcs XR-C1	0,008±0,003	0,004±0,001
	mutante DNA PKcs XR-C2	0,009±0,001	0,004±0,001
	mutante Rad51C CL-V4B	0,012±0,002	0,005±0,001

**Tabla 6.** Coeficientes de las curvas dosis-respuesta, ajustados a una recta, para las ssb y dsb. Estos coeficientes se obtuvieron tras la irradiación de los nucleoides o de las células procedentes de diferentes líneas celulares de hámster chino, procesadas mediante DBD-FISH en cometas neutros, analizando el genoma total (GT) y las secuencias repetitivas teloméricas intersticiales (ITRS).

#### *Cinética de reasociación de ssb y dsb inducidas por rayos X.*

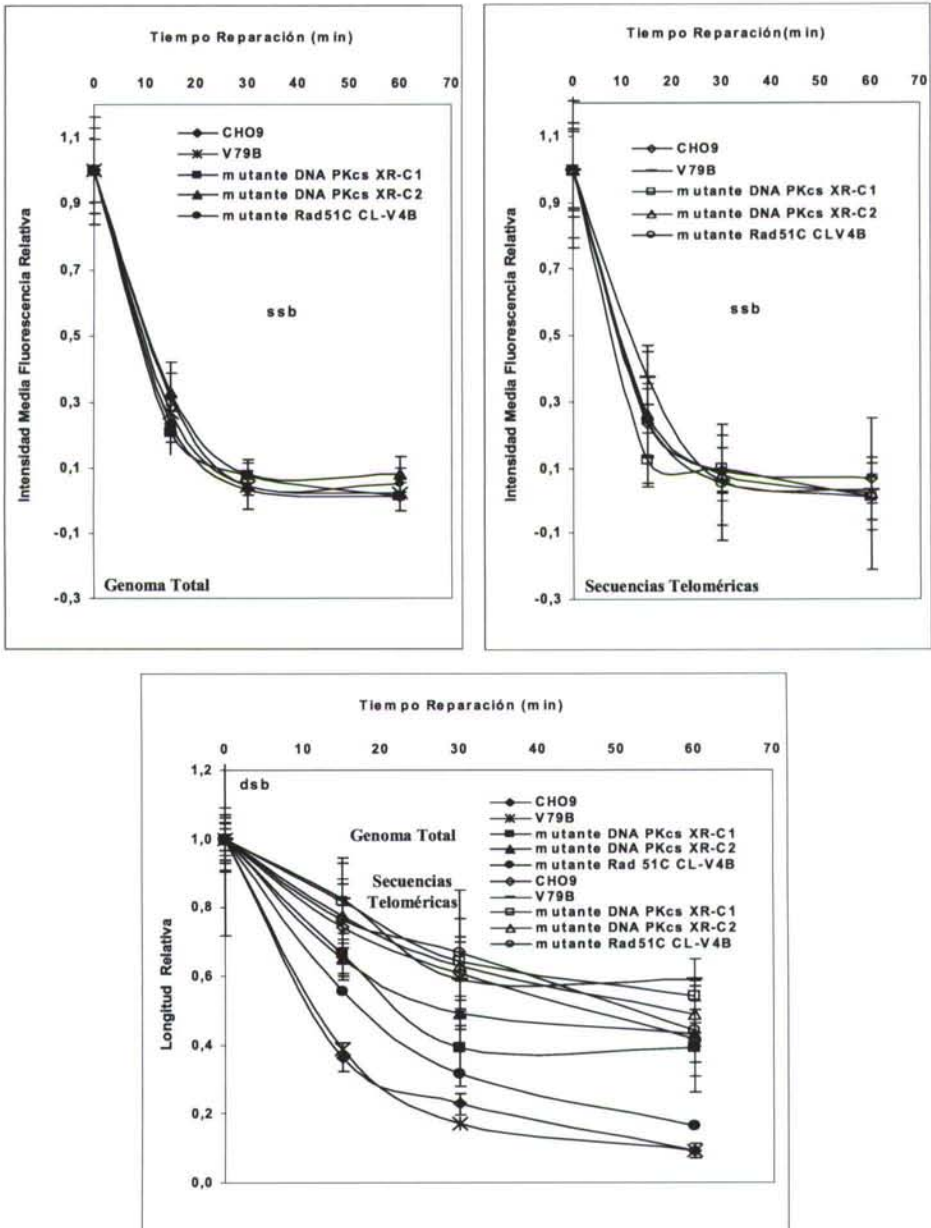
Las ssb inducidas mediante rayos X se reparan rápidamente en células de mamíferos a través de la vía de reparación de escisión de bases. Sin embargo, las dsb plantean una amenaza seria a la integridad del genoma ya que pueden ser unos potentes inductores de aberraciones cromosómicas. Como ya se ha descrito en la introducción, la reparación de las dsb se efectúa, al menos, mediante dos vías principales, HR y NHEJ (Haber, 2000; Karran, 2000; van Gent et al., 2001; Kanna y Jackson, 2001). HR está mediada principalmente por el grupo de genes RAD52. Esta vía requiere una copia homóloga intacta como modelo para la reparación, dando lugar a una reparación precisa de la dsb (Sonoda et al., 2001). En este caso, un extremo 3' invade el dúplex de ADN homólogo y se extiende mediante la acción de la ADN polimerasa. La proteína RAD51 cataliza la reacción de intercambio de cadena, interactuando directa o indirectamente



con proteínas adicionales. Por otra parte, NHEJ comete errores y generalmente da lugar a pequeñas deleciones, siendo probablemente la vía principal de reparación de dsb producidas por la radiación ionizante en las células de mamíferos. En esta vía, la proteína heterodimérica Ku se une a los extremos de ADN, yuxtaponiéndolos y también se requiere a la ADN-PKcs que fosforila varias proteínas dianas. Finalmente, un complejo de ADN ligasa IV y proteína XRCC4 efectúa el paso de unión.

Se ha evaluado la tasa de reunión de ssb y dsb en líneas celulares de hámter chino control (CHO9 y V79) y en mutantes en la ADN-PKcs (XR-C1 y XR-C2). La cinética de reparación de las ssb en las ITRS fue similar a las del genoma total, mientras que, como se esperaba, la ausencia de actividad ADN-PKcs no afectó dicha cinética (Fig. 28). La tasa de reparación de dsb, estudiada por la longitud de migración relativa de la señal de DBD-FISH, fue inicialmente más lenta en las ITRS que en el genoma total, en las células control (Fig. 28). De este modo, la tasa de reasociación de dsb parece no ser homogénea en el genoma, y podría ser modulada de forma diferencial por la estructura de la cromatina, dando lugar a una heterogeneidad intragenómica. En ausencia de actividad ADN-PKcs (ej. mutantes XR-C1 y XR-C2), la tasa de reparación en el genoma total aparece más lenta que en las células control (Fig. 28). Este hecho se ha descrito también en células de ratón *scid*, con mutación en la ADN-PKcs (Sonoda et al., 2001). Sin embargo, y sorprendentemente, la tasa de reparación de dsb en las ITRS no se modificó con respecto al control, a pesar de la ausencia de actividad ADN-PKcs (Fig. 28). De este modo, la actividad ADN-PKcs parece no afectar de modo detectable la tasa de reparación de dsb presentes en las ITRS. Este resultado puede sugerir que las vías de reparación de dsb podrían operar diferencialmente en regiones específicas del genoma. Algunas secuencias de ADN o regiones genómicas con organizaciones cromatínicas específicas pueden estar mediadas preferentemente por una vía/s de reparación de ADN específica. Aunque NHEJ y HR contribuyen a la reparación de dsb, se ha encontrado que su importancia relativa es diferente entre organismos y tipos celulares. Por ejemplo, los fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en la ADN-PKcs son radiosensibles, mientras que esta deficiencia no modifica la radiosensibilidad de células madre de ratón (Gao et al., 1998). Además, al contrario que otros tipos celulares o líneas celulares, la HR parece ser la vía principal de reparación de dsb en la línea celular B de pollo DT40, mientras que la inactivación de Ku70 no afecta su radiosensibilidad. En ese caso, HR parece preferencial en la fase S-G2 tardía del ciclo

celular, mientras que NHEJ juega un papel dominante durante la fase S y G1 temprana (Takata et al., 1998). En otro ejemplo, los ratones mutantes en la DNA-PKcs son hipersensibles a la radiación ionizante, mientras que los ratones Rad 54<sup>-/-</sup> no lo son. Sin embargo, el doble mutante es más radiosensible que el simple, confirmando los papeles diferenciales y complementarios de la reparación de dsb mediante NHEJ o HR (Essers et al., 2000). Sin embargo, el complejo Rad50-Mre11-Nbs1 puede jugar un papel en ambas vías (van Gent et al., 2001), y ambos podrían tener papeles solapados. Sería posible que una vía funciones como alternativa cuando la vía principal no funciona adecuadamente (Takata, 1998). En nuestro caso, la influencia de la vía HR de reparación de dsb se estudió en el mutante de Rad51C CL-V4B (Fig. 28). Rad51C es un componente común de distintos complejos que contienen Rad51, y estas células mutantes son ligeramente, pero consistentemente, hipersensibles a la muerte celular por rayos X (Godthelp et al., 2002). Solamente se ha encontrado una tasa de reparación ligeramente más lenta en las dsb, en el mutante de Rad51, para el genoma total, pero no en las ITRS, sugiriendo una contribución marginal de la vía HR para reparar las dsb producidas por irradiación, como han indicado Wang et al., (2001b). En consecuencia, la tasa de reparación de dsb en ITRS en células de hámster chino parece no estar modificada de modo apreciable en las líneas celulares mutantes de las conocidas vías NHEJ y HR aquí ensayadas. Estos resultados se relacionan con el hecho de que los mutantes para las proteínas implicadas en las vías NHEJ, HR o en ambas, no muestran una eliminación completa de la reparación de dsb (Komatsu et al., 1995; Wachsberger et al., 1999; Haber, 2000; Wang et al., 2001a). Esto es especialmente evidente en la fase inicial inmediatamente después de la exposición, e indica que pueden estar presentes otras vías de reparación relacionadas, desconocidas, redundantes o no relacionadas.



**Figura 28.** Tasa de reparación de las ssb y dsb en el genoma total (símbolos rellenos) y en las ITRS (símbolos vacíos), obtenidas mediante DBD-FISH en cometas neutros tras la irradiación de líneas celulares de hámster chino. No se encontraron diferencias significativas entre las ITRS y el genoma total para las ssb. Sin embargo, las ITRS muestran una tasa de reparación más lenta para las dsb, en comparación con el genoma total. Además, esta cinética no se modifica significativamente en los mutantes DNA-PKcs o Rad 51C.

***“Diferences in repair profiles of  
interstitial telomeric sites between  
normal and DNA double-strand  
break repair deficient Chinese  
hamster cells”***

*© Per-Anders Lagerkvist, Reproductive DNA?*



## Differences in repair profiles of interstitial telomeric sites between normal and DNA double-strand break repair deficient Chinese hamster cells

María Teresa Rivero,<sup>a,b</sup> Alejandro Mosquera,<sup>b</sup> Vicente Goyanes,<sup>a</sup>  
Predrag Slijepcevic,<sup>c</sup> and José Luis Fernández<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Sección de Genética y Unidad de Investigación, Hospital "Teresa Herrera", Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, As Xubias, 86, 15006 La Coruña, Spain

<sup>b</sup>Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, 15009 La Coruña, Spain

<sup>c</sup>Department of Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, UB8 3PH, UK

Received 8 October 2003, revised version received 22 December 2003

### Abstract

Interstitial Telomeric Repeat Sequence (ITRS) blocks are recognized as hot spots for spontaneous and ionizing radiation-induced chromosome breakage and recombination. Background and ionizing radiation-induced DNA breaks in large blocks of ITRS from Chinese hamster cell lines were analyzed using the DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH) procedure. Our results indicate an extremely alkali-sensitivity of ITRS. Furthermore, it appears that ITRS blocks exhibit a particular chromatin structure, being enriched in short unpaired DNA segments. These segments could be liable to severe topological stress in highly compacted areas of the genome resulting in their spontaneous fragility and thus explaining their alkali-sensitivity. The induction and repair kinetics of DNA single-strand breaks (ssb) and DNA double-strand breaks (dsb) induced by ionizing radiation were assessed by DBD-FISH on neutral comets using Chinese hamster cells deficient in either DNA-PKcs or Rad51C. Our results indicate that the initial rejoining rate of dsb within ITRS is slower than that in the whole genome, in wild-type cells, demonstrating an intragenomic heterogeneity in dsb repair. Interestingly, in the absence of DNA-PKcs activity, the rejoining rate of dsb within ITRS is not modified, unlike in the whole genome. This was also found in the case of Rad51C mutant cells. Our results suggest the possibility that different DNA sequences or chromatin organizations may be targeted by specific dsb repair pathways. Furthermore, it appears that additional unknown dsb repair pathways may be operational in mammalian cells. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** DBD-FISH; Comet assay; Interstitial telomeric sequences; DNA single-strand breaks; DNA double-strand breaks; Ionizing radiation; Homologous recombination; Non-homologous end joining

### Introduction

Vertebrate telomeres consist of arrays of TTAGGG repeats associated with specific proteins [1]. The function of telomeres is to prevent end-to-end chromosomal fusions and their exonucleolytic degradation. In addition to the terminal location, telomeric repeat sequences have been detected in intrachromosomal regions in a wide variety of vertebrates [2]. In the case of Chinese hamster (*Cricetus griseus*) cells, extended blocks of ITRS are present in the centromeric–pericentromeric regions of most chromosomes,

comprising hundreds of kilobases (kb) of DNA on each chromosome [3]. In contrast to primary Chinese hamster cells, their immortalized counterparts exhibit much shorter terminal telomeric sequences, which are undetectable by conventional FISH [4]. Possible origins of ITRS include telomere–telomere fusion events during evolution [2,5] or the insertion of telomeric DNA within unstable sites during the repair of dsb [6]. In fact, some relatively small ITRS appear to be flanked by AT rich DNA sequences, which could be unstable [7]. FISH on extended DNA fibers and in mechanically elongated chromosomes demonstrated that these long telomeric-like DNA repeats are continuous, uninterrupted sequences, at least at the resolution power of these procedures [7]. Moreover, they seem not to be associated with the nuclear matrix, unlike terminal telomeric sequences [8].

\* Corresponding author. Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, Avda. de Montserrat s/n, 15009 La Coruña, Spain. Fax: +34-981-287122.

E-mail addresses: [genetica@cog.es](mailto:genetica@cog.es), [JLFernandez@canalejo.org](mailto:JLFernandez@canalejo.org) (J.L. Fernández).

The long ITRS from Chinese hamster cell lines have been found as preferential sites for spontaneous or induced chromosome breakage and recombination [9–17]. Thus, chromosome deletion breakpoints occurring during the karyotypic evolution of immortalized Chinese hamster cell lines tend to cluster within ITRS [14]. In fact, marker chromosomes carrying ITRS from centromeric–pericentromeric origin can often be found at interstitial or terminal locations [10,15–17]. Moreover, ITRS blocks from Chinese hamster cell lines behave as hot spots for ionizing radiation and restriction endonuclease-induced chromosome breakage and recombination [9,11,12,14]. Breakage within the large ITRS blocks may also cause delayed chromosome instability and DNA sequence amplification [10,13]. Besides the long centromeric–pericentromeric ITRS, Chinese hamster chromosomes also contain much shorter arrays of telomeric-like repeats at non-centromeric intrachromosomal positions [15]. Nevertheless, not all ITRS are hot spots for rearrangement [18], and the sensitivity to breakage of short ITRS is not clear [19,20]. Practically all studies on sensitivity to breakage and recombination were performed at the chromosomal level, that is, visualizing the final result of a complex process of induction, signaling, processing and repair of DNA damage induced within a specific DNA sequence and chromatin organization. Here, we have applied the DBD-FISH procedure to analyze (a) the sensitivity of the long ITRS of Chinese hamster cell lines to the initial induction of ssb and dsb, (b) their initial repair kinetics and the influence of DNA-PKcs and Rad51C activity on this repair and (c) to obtain information about their structural organization.

## Materials and methods

### Cell types

Chinese hamster cell lines, wild type (CHO9 and V79B), two mutants without DNA-PKcs activity (XR-C1 and XR-C2), that is, with impaired non-homologous end joining (NHEJ) pathway of dsb repair [21–23], and a Rad51C mutant (CL-V4B), with defective homologous recombination (HR) pathway of dsb repair were used [24]. Cell lines were grown as monolayers in the dark at 37°C in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics and L-glutamine and irradiated under exponentially growing conditions. Conventional FISH with the telomeric probe on mitotic chromosomes from these cell lines only reveals signals from the large centromeric–pericentromeric blocks of ITRS, terminal telomeres and short non-centromeric ITRS being undetectable.

### Cell processing

The DBD-FISH procedure has been described in detail elsewhere [25–27]. Cultured cells mechanically disaggregated and resuspended in RPMI medium were mixed with

1% low-melting point agarose, to achieve the latter a concentration of 0.7%. Fifty microliters of the suspension was pipetted onto a glass slide coated with a thin film of 0.65% standard agarose that previously had been dried at 80°C, covered with a 24 × 60 mm glass coverslip and stored at 4°C for 5 min. After gelification, the slide was exposed on ice to X-rays 100 kVp (Philips RT-100), administering 0, 12.5, 25 and 50 Gy doses in transversal strips on the same slide. Immediately after irradiation, the coverslips were removed and the slides were immersed sequentially in two lysing solutions to obtain nucleoids, that is, practically deproteinized DNA keeping nuclear shape, with extended peripheral loops: 0.4 M Tris–HCl, 0.8 M DTT, 1% SDS, pH 7.5, 42°C, 45 min, followed by 0.4 M Tris–HCl, 2 M NaCl, 1% SDS, 0.05 M EDTA, pH 7.5, 42°C, 45 min. After washing in 0.9% NaCl, nucleoids were unwound in 0.03 M NaOH, 7°C, 2.5 min. After alkaline incubation, a neutralization step was performed with 0.4 M Tris–HCl, pH 7.5 for 5 min. Slides were briefly washed in TBE buffer (0.09 M Tris–Borate, 0.002 M EDTA, pH 7.5), dehydrated in 70%, 90%, 100% ethanol baths, 2 min each and air-dried.

Neutral comets were processed in the same way, except that after incubation in lysing solutions, the slides were washed in abundant TBE buffer for 10 min, transferred to an electrophoresis chamber and electrophoresed at 20 V (1V/cm), 12 mA, 15 min at room temperature (22°C) in TBE buffer. Then they were washed in 0.9% NaCl for 2 min, unwound, neutralized, washed, dehydrated and air-dried.

In other experiments, the irradiation was performed on the nucleoids, that is, the DNA devoid of most of proteins, administering 0, 0.5, 1 and 1.5 Gy of X-rays in transversal strips on the same slide. Then they were electrophoresed under neutral conditions, unwound, neutralized, washed, dehydrated and air-dried.

For experiments aimed at measuring rejoining of DNA breaks, cultured cells in monolayers were exposed to X-rays (50 Gy) on ice and then allowed to recover by adding new media at 37°C, and incubating at 37°C, for 0, 15, 30 and 60 min. All the different incubation times were assayed in each slide, including a microgel containing control-unirradiated cells. This was carried out by pipetting 8 µl of the cell-agarose suspension from each repair time onto separate areas of the same slide, which were covered with a 16 × 16 mm coverslip. Thus, all different repair times were simultaneously processed under the same conditions. Then, the cells were lysed, electrophoresed under neutral conditions, unwound, neutralized, washed, dehydrated and air-dried.

### FISH

Thirty microliters of a Chinese hamster whole genome probe biotin-labeled by nick-translation (4.3 ng/µl in 50% formamide/2 × SSC pH 7, 10% dextran sulphate, 100 mM calcium phosphate) was denatured and pipetted on



dried slides and incubated overnight at room temperature. In other cases, the whole genome probe was mixed 50 times with excess unlabeled telomeric DNA, previously generated by PCR in absence of template. This telomeric DNA was nicked by incubation with DNaseI, combined with the whole genome probe, denatured together and allowed for pre-annealing for 15 min at 37°C. This was a necessary step for in situ suppression of the signal from the telomeric sequences of the whole genome probe. Other slides were incubated with a telomeric probe directly labeled with Cy3 (Cambio). In case of co-incubation, the whole genome probe was mixed with 30 µl of the telomeric probe. The slides were washed in 50% formamide/2 × SSC, pH 7, 5 min, twice and in 2 × SSC, pH 7, 3 min, twice at room temperature. The whole genome probe was detected with streptavidin-Cy3 (1:200), or with avidin-FITC (1:400) in case of simultaneous incubation with the telomeric probe. Finally, the nucleoids-comets were counterstained with DAPI (2 µg/ml) in Vectashield (Vector).

#### *Fluorescence microscopy and digital image analysis*

Signals were viewed under a DMRB epifluorescence microscope (Leica) equipped with a DMRD photoexposer, using PL Fluotar 100× or 40× objectives and appropriate fluorescence filters. Images were acquired using a high-sensitivity CCD camera (Ultrapiix 1600, Astrocams) which distinguishes over 16,000 grey levels and allows subtraction of the current dark image and correction for non-uniform sample illumination. Groups of 50 digital images were taken for each experimental point in similar conditions, stored in the file format of the camera (.apf) and then converted to .img files. Each experiment was repeated at least twice. Image analysis was performed using a macro designed with Visilog 5.1 software (Noesis). This allows for thresholding, background subtraction and measures the surface area (in pixels) and mean fluorescence intensity (mean grey level) of the signals.

In dose-response studies, the relative increase in the migration length and mean fluorescence intensity of the fluorescent signal with respect to that of the unirradiated sample was plotted as a function of dose. In the case of repair studies, the migration length and mean fluorescence intensity from unirradiated sample were subtracted from that of the irradiated sample. The remaining migration length and mean intensity were plotted as a function of repair time. Statistical analysis was carried out using Student's *t* test and one and two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ).

#### *ssDNA labeling*

The nucleoids resulted after cell lysis was washed in TBE buffer and incubated in 0.9% NaCl for 5 min and then in excess mung bean nuclease reaction buffer (50 mM Na acetate, 100 mM NaCl, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, pH 5), four

times, 5 min each. Then, half of the slide was incubated with 25 units of the single-strand specific nuclease mung bean nuclease (New England BioLabs, Beverly, USA) in 50 µl of reaction buffer, for 45 min at 37°C, whereas the other half was covered with mung bean reaction buffer exclusively. The microgel between both halves had been scratched earlier. After this, the nucleoids were incubated in excess exonuclease III reaction buffer (0.66 mM MgCl<sub>2</sub>, 66 mM Tris-HCl, pH 8.0), four times, 5 min each. Half of the slide, including an area of the microgel previously incubated with mung bean nuclease and an area only incubated with the mung bean reaction buffer, was incubated with 100 units of exonuclease III (New England BioLabs) in 50 µl of reaction buffer, for 30 min at 37°C. The rest of the slide was covered by exonuclease III buffer exclusively. After a 5-min washing in excess TBE buffer, the slides were dehydrated in ethanol baths and air-dried. The ssDNA generated by the exonuclease III was detected by hybridization with the mix of the whole genome and telomeric probes, as described. This is equivalent to a FISH with an enzymatic denaturation [28].

## **Results and discussion**

### *Background DBD-FISH signal and structure of ITRS*

Intact Chinese hamster cell lines were processed for DBD-FISH hybridizing a whole genome probe. The background signal obtained using very restricted alkaline unwinding conditions (0.03 M NaOH, 7°C, 2.5 min) to generate short ssDNA motifs starting from the ends of basal DNA breaks and alkali-labile sites is presented in Fig. 1. It was evident that the DBD-FISH signal was not homogeneously distributed within the nucleoid, areas of stronger background being clearly visualized. A simultaneous hybridization with a telomeric probe showed that the stronger labeled areas with the whole genome probe co-hybridized with the telomeric probe, revealing that the alkali generates a higher density of ssDNA in the ITRS (Fig. 1). This result was also obtained when the unwinding step was performed before the lysis. Moreover, conventional FISH on metaphases with the whole genome probe did not result in stronger hybridization regions in the localization of the ITRS, indicating no preferential hybridization of these repetitive sequences. Our observation suggests that the ITRS exhibit the highest alkali-sensitivity in the genome of Chinese hamster cells. This is an unexpected finding, since telomeric sequences are considered to be GC-rich in relation to the rest of the genome and are expected not to denature easily. In conclusion, it seems likely that there is some modification in the native DNA from ITRS that makes it very alkali-sensitive.

The nature of these constitutive alkali-labile sites in ITRS was analyzed by an in situ digestion with exonuclease III

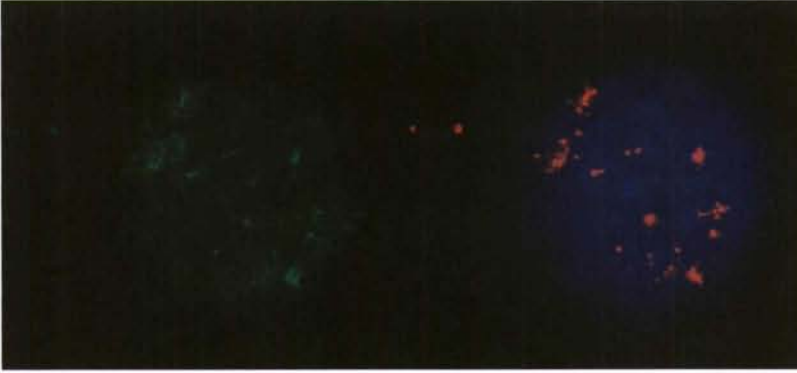


Fig. 1. Background DBD-FISH signals in a Chinese hamster cell after simultaneous hybridization of a whole genome probe (green, left) and a telomeric probe (red, right) with DAPI counterstaining (blue). A co-localization of the background signal from ITRS with those strong areas observed with the whole genome probe is evident, demonstrating an extremely alkali-sensitive of ITRS.

(Fig. 2). This nuclease generates ssDNA motifs from 3' ends of DNA breaks. Furthermore, it cleaves abasic sites, apurinic and apyrimidinic (AP) sites also producing ssDNA stretches from these sites [29]. It is known that the alkali also transforms these AP sites into DNA strand breaks, so they constitute alkali labile-sites [30,31]. The ssDNA generated after exonuclease III digestion may be detected by hybridization with the whole genome probe [28] (Figs. 2a, b). In this case, a clear heterogeneity in labeling was not as evident, though areas with slightly stronger hybridization that co-localized with the telomeric signal were detected.

This indicates that the AP sites only minimally contribute to the alkali-sensitivity of ITRS.

It has been reported that DNA in chromatin from mitotic cells is more sensitive to denaturation than was the DNA in chromatin of interphase cells [32,33]. In situ digestion with single-strand-specific nucleases, like S1 and mung bean nucleases, demonstrated that this sensitivity was related to a higher abundance in mitotic chromosomes of short unpaired DNA segments [34]. Based on these observations, it was hypothesized that the stronger torsional tension in DNA loops of mitotic chromosomes may

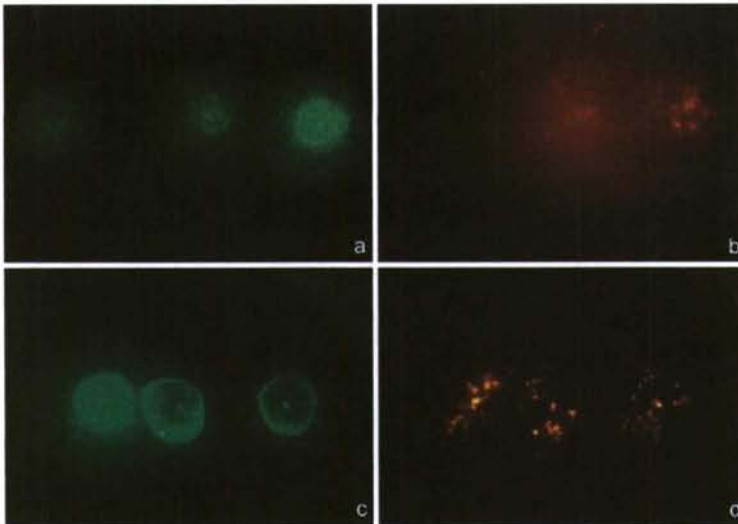


Fig. 2. Deproteinized Chinese hamster cells in situ digested with exonuclease III (a, b) and with mung bean nuclease before exonuclease III (c, d). The single-stranded DNA generated by exonuclease III was detected by a simultaneous hybridization with the whole genome (green; a, c) and telomeric (red; b, d) probes. The sequential mung bean nuclease–exonuclease III digestion, results in areas of stronger signal within the nucleoid with the whole genome probe (c) that co-localize with the telomeric signals (d). This suggests that the ITRS blocks exhibit a particular chromatin structure being enriched in short unpaired DNA segments.



lead to the formation of a higher frequency of single-stranded hairpin-loop structures which are sensitive to single-strand-specific nucleases. These localized unpaired DNA segments are very small to be detectable by acridine orange staining or by FISH. Nevertheless, they would behave as starting points from which the denaturing agents would initiate the generation of extensive ssDNA that then becomes detectable by these procedures. We employed mung bean nuclease to digest very short unpaired DNA stretches present in the nucleoid. Sequential incubation with exonuclease III transforms the 3'-OH ends resulted after mung bean nuclease digestion into ssDNA motifs that will hybridize the DNA probes. Thus, the increase in hybridization signal after sequential mung bean nuclease–exonuclease III compared to exonuclease III alone will be dependent on the extra ssDNA generated by exonuclease III from the unpaired DNA segments removed by mung bean nuclease. This sequential incubation resulted in areas of stronger signal within the nucleoid with the whole genome probe that co-localized with the telomeric signals (Figs. 2c, d), suggesting that the ITRS blocks exhibit a particular chromatin structure, being enriched in short unpaired DNA segments that could be the main reason for their marked alkali-sensitivity. The constitution of a highly compacted chromatin structure specifically in the long ITRS blocks may result in a greater torsional stress that will produce a high density of short unpaired DNA segments within. Since ssDNA is known to be much more sensitive than double-stranded DNA to several types of DNA damage [35,36], the higher density of unpaired DNA segments could explain the relative higher frequency of background DNA damage and sensitivity to ionizing radiation in long ITRS blocks. Otherwise, the constitution of this specific chromatin structure could be the main factor that explains why some ITRS are sensitive and some are not. Possibly, very short ITRS, either constitutional or those formed after integration by transfection of small plasmids [19] may not achieve a critical size or orientation to be organized in the same way as the specific chromatin structure that may confer sensitivity to breakage and recombination. In that case, the short ITRS should not be directly responsible for chromosomal fragility being inserted within preexisting fragile regions [7]. The orientation of the telomeric sequence seems to play an essential role in the determination of the sensitivity. Thus, there was a dramatic increase in gene rearrangements when an 800-bp telomeric sequence was inserted in both orientations in the second intron of the APRT gene in Chinese hamster ovary cells, whereas the insertion in one orientation or in the other did not result in breakage and recombination [20]. Moreover, it was demonstrated that a murine ITRS having an inverted repeated structure was radiation-sensitive, whereas an ITRS with a simple tandem repeat organization was not [37]. It is possible that these structures promote a specific secondary higher-order chromatin organization,

enriched in short unpaired DNA segments that may confer chromosomal fragility.

#### *Sensitivity to ionizing radiation-induced ssb and dsb*

When the nucleoids are electrophoresed under neutral conditions, their migration length is related to the dsb yield. Then, the comet can be unwound in alkali to transform the DNA breaks and alkali-labile sites into restricted ssDNA motifs that will hybridize the DNA probes, obtaining a DBD-FISH signal. Thus, the migration length of this signal should be related to the ionizing radiation-induced dsb yield, whereas the mean fluorescence intensity of the same signal would be indicative of the ssb and alkali-labile sites [38]. This approach was employed to study the ssb and dsb initially induced by X-rays within the ITRS and in the whole genome.

To establish a comparison between both targets, three points were taken into account. First, the sequence size as well as their background signal were quite different, so only relative values of the increase in the DBD-FISH signal in a specific target, with respect to the specific background signal from the same target could be used to compare their sensitivities [39]. Second, since most of the background signal in the whole genome was dependent on that from ITRS, the dose-response in the whole genome was performed using a whole genome probe where the strong signal from ITRS had been partially suppressed by previous incubation with excess unlabeled telomeric DNA sequences (Fig. 3). Third, the alkali could generate a different length of

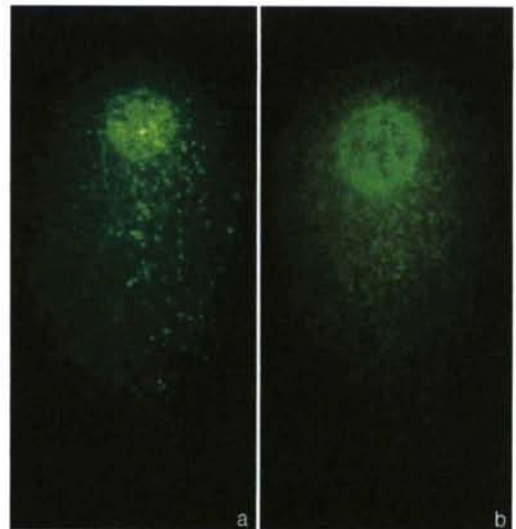


Fig. 3. DBD-FISH on neutral comets from Chinese hamster cells, after hybridization of a whole genome probe without (a) and with (b) suppression of the signal from the ITRS.

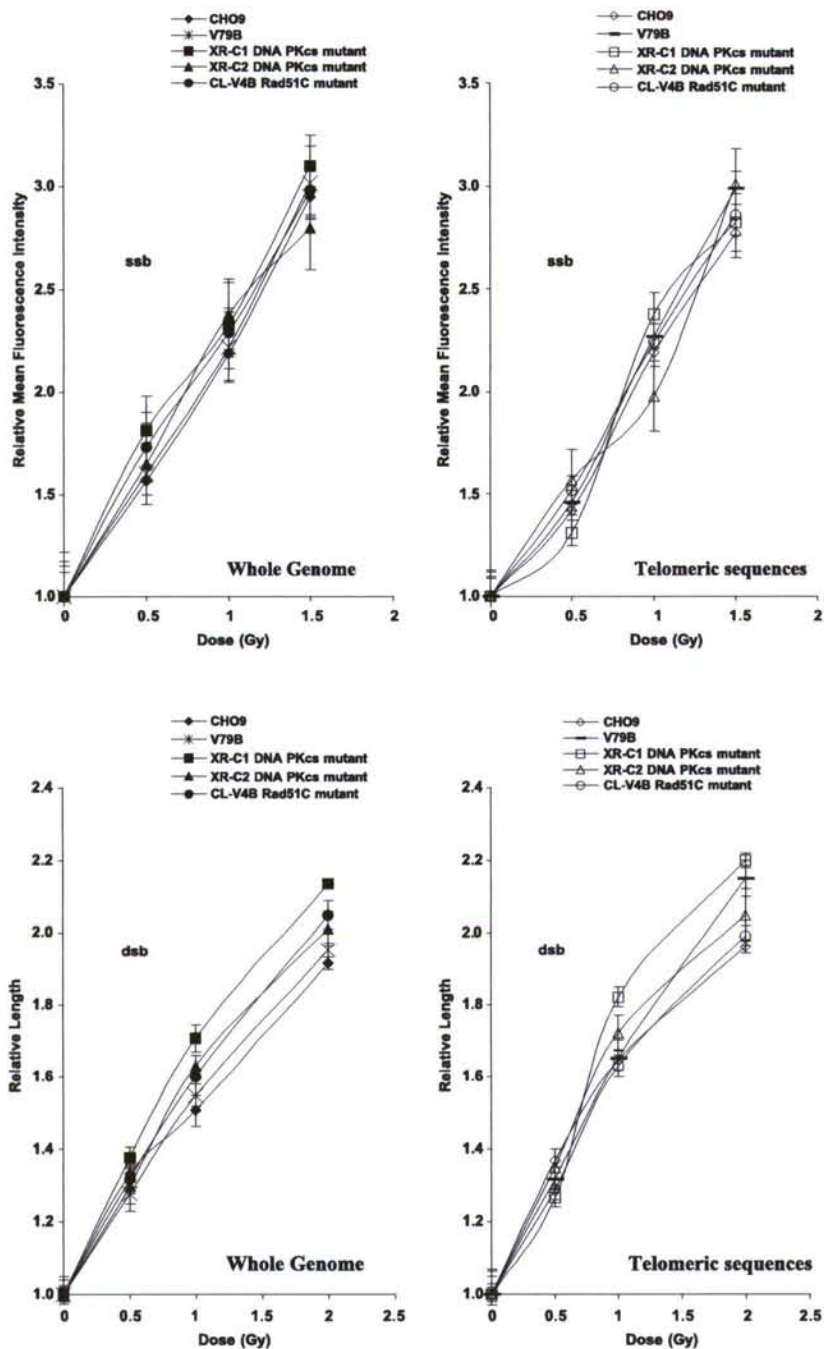


Fig. 4. Dose–response curves for ssb and dsb in the whole genome (filled symbols) and in the ITRS (empty symbols) obtained by DBD-FISH on neutral comets after irradiation of deproteinized Chinese hamster cell lines. No significant differences were found between ITRS and in the whole genome for both types of DNA damage.



ssDNA from a break induced in different targets, and the renaturation rate may also be different. To estimate these possible differences in unwinding-renaturation rates in the ITRS compared to the whole genome, protein-depleted nucleoids obtained after cell lysis were irradiated, electrophoresed, unwound and hybridized. Since irradiation is performed on practically naked DNA, without differential chromatin structures, a random induction of DNA breaks at the submicroscopic level may be assumed. So the same density of DNA breaks, that is, DNA breaks per unit length, should be homogeneously induced in the different targets, the linear coefficients of the dose–response curves reflecting their unwinding-renaturation rates [39]. The dose–response curves following irradiation of nucleoids from different Chinese hamster cell lines and their coefficients are presented in Fig. 4 and Table 1. No differences were evident among the different cell lines, and between ITRS blocks and the whole genome, either for the relative increase in mean fluorescence intensity, that is, ssb, or for the relative increase in migration length, that is, dsb. In consequence, irradiation of nucleoids demonstrated that ITRS have a similar unwinding-renaturation rate and electrophoretic mobility as DNA sequences from the rest of the genome. It means that no correction factor for these parameters is necessary in the dose–response signal resulting after whole-cell irradiation.

Next, the dose–response curves for induction of dsb and ssb for X-ray-exposed Chinese hamster cell lines were

generated (Figs. 5 and 6, Table 1). Again, no differences were found among the different cell lines. In relation to ssb, the relative increase in mean fluorescence intensity with dose for ITRS was similar to that of the whole genome. So, ssb were induced with similar density within ITRS and in the whole genome in an intact cell. Nevertheless, in case of the relative increase in migration length, ITRS were less mobilized than the whole genome by a factor of 0.5. Therefore, the electrophoretic mobilization of ITRS blocks with radiation-induced dsb in a cell with its native chromatin organization that is half of the whole genome. Nevertheless, since the density of induced ssb was similar in both targets, it is not probable that the density of induced dsb would be different. Therefore, it seems likely that, for a same dsb density, the electrophoretic mobilization in the comet assay may be different in different DNA sequence areas. This differential mobilization is difficult to explain since it has not been evident when the irradiation had been performed on nucleoids. Possibly, it could be related to entangling of the ITRS, which would difficult their migration. ITRS are known to cluster in the interphase nucleus forming chromocenter-like structures, which has been proposed as one of the causes for high induction of exchange aberrations involving these regions. Whereas ITRS tend to cluster at regions within the interphase nucleus being susceptible of entangling, they disperse in the nucleoid. Induction of DNA breaks on spread ITRS sequences would increase their relaxation within the nucleoid, so they would migrate as free as the genome overall. Nevertheless, in case of irradiation of clustered ITRS, possible interactions could remain despite lysis, keeping a relative entangling level or interactions among them could be generated, for example, due to differentially induced crosslinks, thus being less free to migrate.

#### Rejoining kinetics of ssb and dsb induced by X-rays

Ionizing radiation-induced ssb are rapidly repaired in mammalian cells through the base excision repair pathway [40]. However, dsb pose a serious threat to genome integrity since they can be potent inducers of chromosomal aberrations. Dsb repair is accomplished by two main pathways at least, HR and NHEJ [41–44]. HR is mainly mediated by the RAD52 epistasis group of genes. It requires an intact homologous copy as repair template, ensuring an accurate dsb repair [45]. In this case, a resected 3' end invades the homologous DNA duplex and is extended by DNA polymerase. The Rad51 protein catalyzes the strand-exchange reaction, interacting directly or indirectly with additional proteins, including Rad51 paralogs. Otherwise, NHEJ is error-prone and generally leads to small sequence deletions, being probably the main repair pathway of ionizing radiation-induced dsb in mammalian cells. In this pathway, the heterodimer Ku protein binds to the DNA ends, juxtaposing them and recruiting the DNA-PKcs that phosphorylates several target proteins. Finally, a complex of DNA ligase

Table 1  
Coefficients of the dose–response curves fitted to linear curves for DNA single-strand breaks (ssb) and DNA double-strand breaks (dsb)

Nucleoids	Cell line	WG	ITRS
ssb	CHO9	1.29 ± 0.06	1.22 ± 0.09
	V79B	1.34 ± 0.07	1.36 ± 0.10
	XR-C1 DNA PKcs mutant	1.36 ± 0.08	1.31 ± 0.20
	XR-C2 DNA PKcs mutant	1.23 ± 0.09	1.29 ± 0.18
	CL-V4B Rad51C mutant	1.30 ± 0.04	1.26 ± 0.05
dsb	CHO9	0.44 ± 0.04	0.47 ± 0.07
	V79B	0.47 ± 0.03	0.57 ± 0.03
	XR-C1 DNA PKcs mutant	0.56 ± 0.06	0.62 ± 0.10
	XR-C2 DNA PKcs mutant	0.50 ± 0.05	0.52 ± 0.08
	CL-V4B Rad51C mutant	0.52 ± 0.03	0.50 ± 0.05
Cells		WG	ITRS
ssb	CHO9	0.029 ± 0.002	0.025 ± 0.001
	V79B	0.034 ± 0.002	0.021 ± 0.003
	XR-C1 DNA PKcs mutant	0.029 ± 0.002	0.026 ± 0.001
	XR-C2 DNA PKcs mutant	0.027 ± 0.003	0.024 ± 0.003
	CL-V4B Rad51C mutant	0.022 ± 0.003	0.019 ± 0.004
dsb	CHO9	0.010 ± 0.002	0.005 ± 0.001
	V79B	0.014 ± 0.002	0.006 ± 0.001
	XR-C1 DNA PKcs mutant	0.008 ± 0.003	0.004 ± 0.001
	XR-C2 DNA PKcs mutant	0.009 ± 0.001	0.004 ± 0.001
	CL-V4B Rad51C mutant	0.012 ± 0.002	0.005 ± 0.001

They were obtained after irradiation of nucleoids or cells from different Chinese hamster cell lines, processed for DBD-FISH on neutral comets, analyzing the whole genome (WG) and the Interstitial Telomeric Repeat Sequences (ITRS).

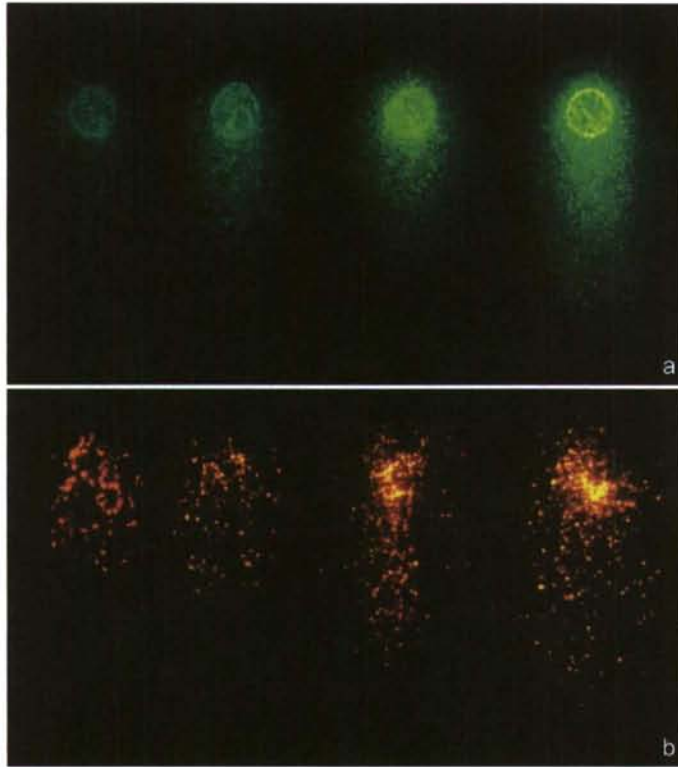


Fig. 5. Representative DBD-FISH signals on neutral comets obtained after irradiation with increasing doses of X-rays (0, 15, 25 and 50 Gy, from left to right) in the whole genome (green, a), and in the ITRS (red, b), of Chinese hamster cells.

IV and XRCC4 protein accomplishes the ligation step. The rejoining rate of ssb and dsb was evaluated in wild-type cells (CHO9 and V79B) and DNA-PKcs mutants, lacking normal DNA-PKcs activity, XR-C1 and XR-C2. The repair kinetics of ssb in the ITRS was similar to that of the whole genome, and the absence of DNA-PKcs activity did not affect this as expected (Fig. 7). The rejoining rate of dsb, as assessed by the relative migration length of the DBD-FISH signal, was initially slower in the ITRS than in the whole genome in wild-type cells (Fig. 7). Thus, the rejoining rate of dsb may not be homogeneous and could be differentially modulated by the chromatin structure, resulting in intragenomic heterogeneity. In the absence of normal DNA-PKcs activity (i.e., mutants XR-C1 and XR-C2), the repair rate of dsb in the genome overall appears to be slower in the wild-type cells (Fig. 7). Similar observations have been made in *scid* mouse cells with mutant DNA-PKcs [46]. Nevertheless, and surprisingly, the rejoining rate of dsb within ITRS was not modified with respect to the control, despite the absence of DNA-PKcs function (Fig. 7). Thus, DNA-PKcs activity seems not to affect the rejoining rate of dsb present in ITRS. This result indicates that the dsb repair pathways operate differently in specific regions of the genome, some DNA

sequences or genomic regions with specific chromatin organizations may be targeted by specific DNA repair pathway(s). Though both NHEJ and HR contribute to dsb repair, their relative importance was found to be different between organisms and cell types. For example, DNA-PKcs-deficient mouse embryonic fibroblasts are radiosensitive, whereas this deficiency does not modify the radiosensitivity of mouse ES cells [47]. Moreover, contrary to other cell types or cell lines, HR seems to be the main pathway for dsb repair in the DT40 chicken B-cell line, whereas inactivation of Ku70 does not affect their radiosensitivity. In that case, HR was preferential in late S-G2 phase of the cell cycle, while NHEJ played a dominant role during G1-early S phase [48]. In another example, DNA-PKcs mutant mice are hypersensitive to ionizing radiation, whereas Rad54<sup>-/-</sup> mice are not. However, the double mutant is more radiosensitive than the single DNA-PKcs mutant, confirming the differential and complementary roles of NHEJ and HR in dsb repair [49]. Nevertheless, the Rad50–Mre11–Nbs1 complex may play a role in both pathways [43], and both could have overlapping roles, possibly one pathway being a back-up mechanism when the main one does not function properly [48]. In our case, the influence of the HR pathway of dsb repair was



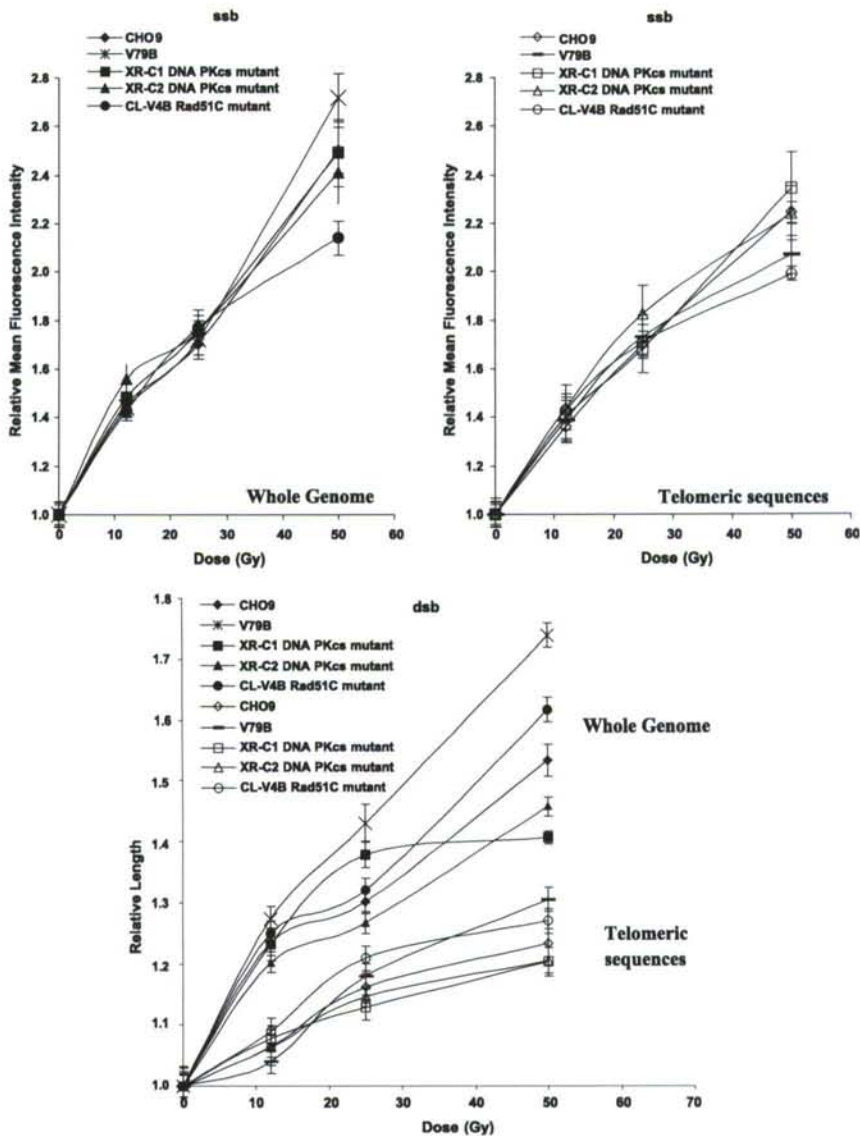


Fig. 6. Dose–response curves for ssb and dsb in the whole genome (filled symbols) and in the ITRS (empty symbols) obtained by DBD-FISH on neutral comets after irradiation of Chinese hamster cell lines. No significant differences were found between ITRS and in the whole genome for ssb. Nevertheless, the relative migration length (dsb) of the ITRS was half to that of the whole genome.

assessed using the Rad51C mutant CL-V4B (Fig. 7). Rad51C is a common component of distinct Rad51 paralogue-containing complexes, and these mutant cells are slightly, but consistently, sensitive to cell killing by X-rays [24]. Thus, this sensitivity has been described both in the CL-V4B and in another Rad51C Chinese hamster mutant cell line [24,50]. Only a slightly slower initial rejoining rate of dsb was found in the Rad51C mutant for the whole

genome, but not in the ITRS, suggesting a marginal contribution of the HR to rejoining of ionizing radiation induced dsb, as reported by Wang et al. [51]. In consequence, the rejoining rate of dsb in ITRS from Chinese hamster cells seems not to be markedly modified in mutant cell lines from the known NHEJ and HR pathways. This finding relates with the fact that mutants for proteins involved in NHEJ, HR, or even for both pathways, do not show a completely abolished

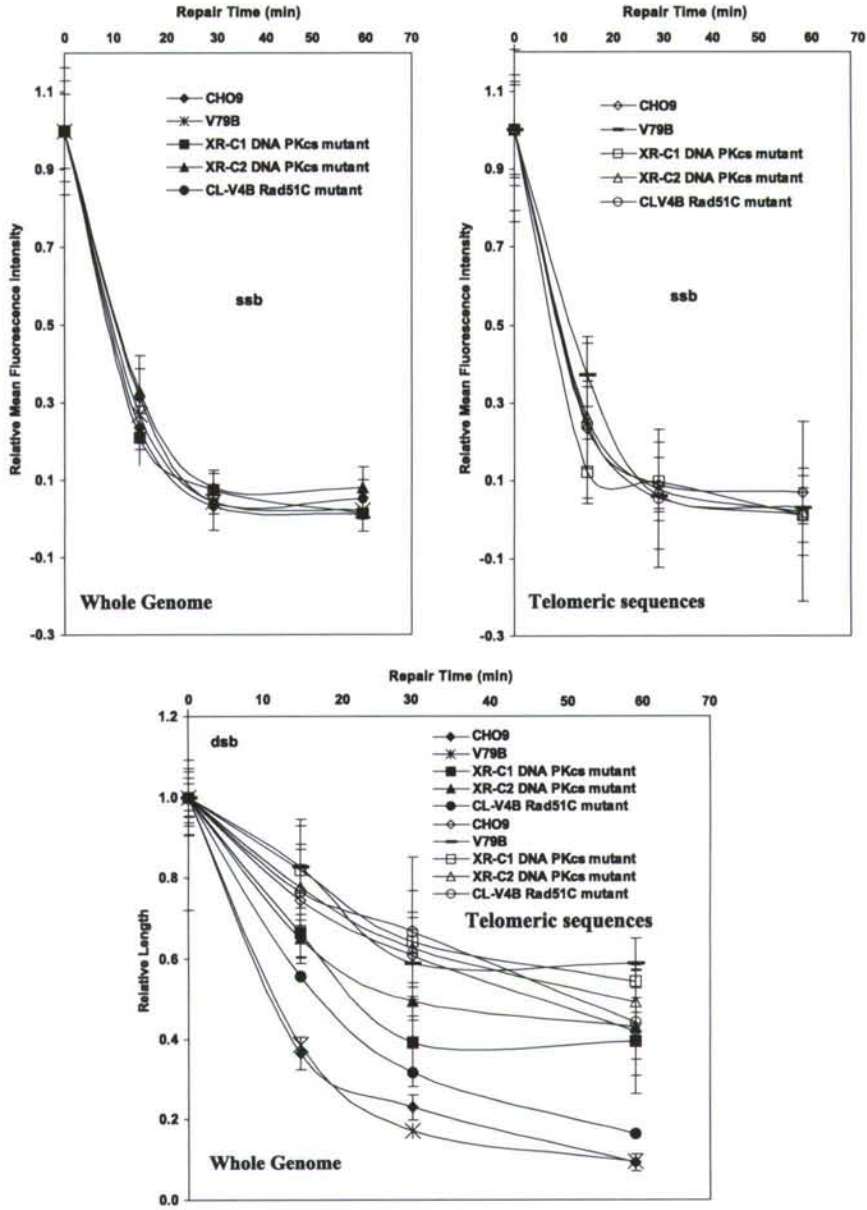


Fig. 7. Rejoining rate of ssb and dsb in the whole genome (filled symbols) and in the ITRS (empty symbols) obtained by DBD-FISH on neutral comets after irradiation of Chinese hamster cell lines. No significant differences were found between ITRS and in the whole genome for ssb. Nevertheless, ITRS show a slower rejoining rate of dsb than that of the whole genome. Moreover, this is not significantly modified in the DNA-PKcs or in the Rad51C mutants.

dsb repair [52–55]. This is especially evident immediately after the exposure, and indicates that unknown related, redundant, or unrelated dsb repair pathways may be present. Moreover, the possibility of a different contribution of both dsb repair pathways exists, in case of inhibition of one of them, and this new contribution could also be different

depending on the chromatin region. The use of double mutant cell lines for both NHEJ and HR could perhaps help discriminate if one dsb repair pathway may be more active in case of inhibition of the other. Finally, synchronization of cell lines would also improve the evaluation of the relative roles of the dsb repair pathways.

## Acknowledgments

We are indebted to M. Zdzienicka for the cell lines and critical reading of the manuscript. This work was supported by the European Union Radiation Protection Program (Fifth Framework Program, FIGH-CT-2002-00217, TELOSENS), the Consejo de Seguridad Nuclear (CSN), the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, 01-3113) and Xunta de Galicia (PGIDIT02PXIC91603PN and PGIDIT03PXI C91603PN).

## References

- [1] R.K. Moyzis, J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, J.R. Wu, A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) $_n$ , present at the telomeres of human chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 6622–6626.
- [2] J. Meyne, R.J. Baker, H.H. Hobart, T.C. Hsu, O.A. Ryder, O.G. Ward, J.E. Wiley, D.H. Wurster-Hill, T.L. Yates, Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG) $_n$  telomeric sequence in vertebrate chromosomes, *Chromosoma* 99 (1990) 3–10.
- [3] M. Faravelli, D. Moralli, L. Bertoni, C. Attolini, O. Chernova, E. Raimondi, E. Giulotto, Two extended arrays of a satellite DNA sequence at the centromere and at the short-arm telomere of Chinese hamster chromosome 5, *Cytogenet. Cell Genet.* 83 (1998) 281–286.
- [4] P. Slijepcevic, P.E. Bryant, Absence of terminal telomeric FISH signals in chromosomes from immortal Chinese hamster cells, *Cytogenet. Cell Genet.* 69 (1995) 87–89.
- [5] N.D. Hastie, R.C. Allshire, Human telomeres: fusion and interstitial sites, *Trends Genet.* 5 (1989) 326–331.
- [6] C.M. Azzalin, S.G. Nergadze, E. Giulotto, Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin, *Chromosoma* 110 (2001) 75–82.
- [7] M. Faravelli, C.M. Azzalin, L. Bertoni, O. Chernova, C. Attolini, C. Mondello, E. Giulotto, Molecular organization of internal telomeric sequences in Chinese hamster chromosomes, *Gene* 283 (2002) 11–16.
- [8] A.S. Balajee, I. Dominguez, V.A. Bohr, A.T. Natarajan, Immunofluorescent analysis of the organization of telomeric DNA sequences and their involvement in chromosomal aberrations in hamster cells, *Mutat. Res.* 372 (1996) 163–172.
- [9] L. Alvarez, J.W. Evans, R. Wilks, J.N. Lucas, J.M. Brown, A.J. Giaccia, Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites, *Genes, Chromosomes Cancer* 8 (1993) 8–14.
- [10] L. Bertoni, C. Attolini, L. Tessera, E. Mucciolo, E. Giulotto, Telomeric and nontelomeric (TTAGGG) $_n$  sequences in gene amplification and chromosome stability, *Genomics* 24 (1994) 53–62.
- [11] A.S. Balajee, A.T. Natarajan, Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH, *Mutat. Res.* 307 (1994) 307–313.
- [12] J.L. Fernández, J. Gosalvez, V. Goyanes, High frequency of mutagen-induced chromatid exchanges at interstitial telomere-like DNA sequence blocks of Chinese hamster cells, *Chromosome Res.* 3 (1995) 281–284.
- [13] T.K. Pandita, D. DeRubeis, Spontaneous amplification of interstitial telomeric bands in Chinese hamster ovary cells, *Cytogenet. Cell Genet.* 68 (1995) 95–101.
- [14] P. Slijepcevic, Y. Xiao, I. Dominguez, A.T. Natarajan, Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites, *Chromosoma* 104 (1996) 596–604.
- [15] L. Bertoni, C. Attolini, M. Faravelli, S. Simi, E. Giulotto, Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster, *Mamm. Genome* 7 (1996) 853–855.
- [16] P. Slijepcevic, Y. Xiao, A.T. Natarajan, P.E. Bryant, Instability of CHO chromosomes containing interstitial telomeric sequences originating from Chinese hamster chromosome 10, *Cytogenet. Cell Genet.* 76 (1997) 58–60.
- [17] S. Simi, C. Attolini, E. Giulotto, Intrachromosomal telomeric repeats and stabilization of truncated chromosomes in V79 Chinese hamster cells, *Mutat. Res.* 397 (1998) 229–233.
- [18] S.D. Bouffler, Involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* 404 (1998) 199–204.
- [19] C. Desmaze, C. Alberti, L. Martins, G. Pottier, C.N. Sprung, J.P. Murnane, L. Sabatier, The influence of interstitial telomeric sequences on chromosome instability in human cells, *Cytogenet. Cell Genet.* 86 (1999) 288–295.
- [20] A.E. Kilburn, M.J. Shea, R.G. Sargent, J.H. Wilson, Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 126–135.
- [21] A. Errami, N.J. Finnie, B. Morolli, S.P. Jackson, P.H. Lohman, M.Z. Zdzienicka, Molecular and biochemical characterization of new X-ray-sensitive hamster cell mutants defective in Ku80, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 4332–4338.
- [22] A. Errami, W.J. Overkamp, D.M. He, A.A. Friedl, D.A. Gell, F. Eckardt-Schupp, S.P. Jackson, E.A. Hendrickson, P.H. Lohman, M.Z. Zdzienicka, A new X-ray sensitive CHO cell mutant of ionizing radiation group 7, XR-C2, that is defective in DSB repair but has only a mild defect in V(D)J recombination, *Mutat. Res.* 461 (2000) 59–69.
- [23] T. Woods, W. Wang, E. Convery, A. Errami, M.Z. Zdzienicka, K. Meek, A single amino acid substitution in DNA-PKcs explains the novel phenotype of the CHO mutant, XR-C2, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 5120–5128.
- [24] B.C. Godthelp, W.W. Wiegant, A. van Duijn-Goedhart, O.D. Scharer, P.P. van Buul, R. Kanaar, M.Z. Zdzienicka, Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2172–2182.
- [25] J.L. Fernández, F. Vázquez-Gundín, M.T. Rivero, V. Goyanes, J. Gosalvez, Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH, *Mutat. Res.* 473 (2001) 163–168.
- [26] J.L. Fernández, J. Gosalvez, Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH), in: V. Didenko (Ed.), *Methods Mol. Biol.*, Humana Press, Houston, 2002, pp. 203–216.
- [27] J.L. Fernández, V. Goyanes, J. Gosalvez, DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH), in: B. Rautenstrauss, T. Liehr (Eds.), *FISH Technology-Springer Lab. Manual*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2002, pp. 282–290.
- [28] J. Gosalvez, J. de la Torre, C. Lopez-Fernández, J.L. Fernández, The combined use of nuclease in situ digestion and FISH (NU-FISH), in: B. Rautenstrauss, T. Liehr (Eds.), *FISH Technology-Springer Lab. Manual*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2002, pp. 272–281.
- [29] P.K. Liu, J. Ciu, N. Moore, D. Huang, The in situ detection of apurinic/aprimidinic sites and DNA breaks bearing extension blocking termini, in: V. Didenko (Ed.), *Methods Mol. Biol.*, Humana Press, Houston, 2002, pp. 235–244.
- [30] R. Teoule, Radiation-induced DNA damage and its repair, *Int. J. Radiat. Biol.* 51 (1987) 573–589.
- [31] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis Ltd., London, 1987.
- [32] Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, S.P. Carter, P.J. Higgins, In situ factors affecting stability of the DNA helix in interphase nuclei and metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.* 172 (1987) 168–179.
- [33] Z. Darzynkiewicz, Acid-induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure, *Methods Cell Biol.* 41 (1994) 527–541.
- [34] G. Juan, W. Pan, Z. Darzynkiewicz, DNA segments sensitive to single-strand-specific nucleases are present in chromatin of mitotic cells, *Exp. Cell Res.* 227 (1996) 197–202.
- [35] R. Shapiro, *Damage to DNA Caused by Hydrolysis*, Plenum, New York, 1981.



- [36] J. Legault, A. Tremblay, M.E. Mirault, Preferential localization of DNA damage induced by depurination and bleomycin in a plasmid containing a scaffold-associated region, *Biochem. Cell Biol.* 75 (1997) 369–375.
- [37] S. Bouffler, A. Silver, D. Papworth, J. Coates, R. Cox, Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome 2 fragile sites, *Genes, Chromosomes Cancer* 6 (1993) 98–106.
- [38] J.L. Fernández, F. Vázquez-Gundín, M.T. Rivero, A. Genescá, J. Gosálvez, V. Goyanes, DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and double-strand breaks in individual cells, *Exp. Cell Res.* 270 (2001) 102–109.
- [39] F. Vázquez-Gundín, M.T. Rivero, J. Gosálvez, J.L. Fernández, Radiation-induced DNA breaks in different human satellite DNA sequence areas, analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* 157 (2002) 11–20.
- [40] M.R. Shen, M.Z. Zdzienicka, H. Mohrenweiser, L.H. Thompson, M.P. Thelen, Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1032–1037.
- [41] J.E. Haber, Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet.* 16 (2000) 259–264.
- [42] P. Karran, DNA double strand break repair in mammalian cells, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10 (2000) 144–150.
- [43] D.C. van Gent, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat. Rev., Genet.* 2 (2001) 196–206.
- [44] K.K. Khanna, S.P. Jackson, DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.* 27 (2001) 247–254.
- [45] E. Sonoda, M. Takata, Y.M. Yamashita, C. Morrison, S. Takeda, Homologous DNA recombination in vertebrate cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8388–8394.
- [46] B. Nevaldine, J.A. Longo, P.J. Hahn, The scid defect results in much slower repair of DNA double-strand breaks but not high levels of residual breaks, *Radiat. Res.* 147 (1997) 535–540.
- [47] Y. Gao, J. Chaudhuri, C. Zhu, L. Davidson, D.T. Weaver, F.W. Alt, A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination, *Immunity* 9 (1998) 367–376.
- [48] M. Takata, M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, S. Takeda, Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *EMBO J.* 17 (1998) 5497–5508.
- [49] J. Essers, H. van Steeg, J. de Wit, S.M. Swagemakers, M. Vermeij, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice, *EMBO J.* 19 (2000) 1703–1710.
- [50] C.A. French, J.Y. Masson, C.S. Griffin, P. O'Regan, S.C. West, J. Thacker, Role of mammalian RAD51L2 (RAD51C) in recombination and genetic stability, *J. Cell Biol.* 277 (2002) 19322–19330.
- [51] H. Wang, Z.C. Zeng, T.A. Bui, E. Sonoda, M. Takata, S. Takeda, G. Iliakis, Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group, *Oncogene* 20 (2001) 2212–2224.
- [52] K. Komatsu, N. Kubota, M. Gallo, Y. Okumura, M.R. Lieber, The scid factor on human chromosome 8 restores V(D)J recombination in addition to double-strand break repair, *Cancer Res.* 55 (1995) 1774–1779.
- [53] P.R. Wachsberger, W.H. Li, M. Guo, D. Chen, N. Cheong, C.C. Ling, G. Li, G. Iliakis, Rejoining of DNA double-strand breaks in Ku80-deficient mouse fibroblasts, *Radiat. Res.* 151 (1999) 398–407.
- [54] J.E. Haber, Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet.* 16 (2000) 259–264.
- [55] H. Wang, Z.C. Zeng, T.A. Bui, S.J. DiBiase, W. Qin, F. Xia, S.N. Powell, G. Iliakis, Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2, *Cancer Res.* 61 (2001) 270–277.



# ***Conclusiones***

**A) Respecto a la señal basal de DBD-FISH en células de ratón:**

1. Cuando se realiza la técnica de DBD-FISH hibridando con sonda de ADN genómico total, la señal basal es, respecto al tamaño (área), 3 veces mayor en los esplenocitos de ratón, en comparación con los leucocitos humanos, en los dos protocolos de desnaturalización empleados.
2. El ADN satélite principal es el responsable mayoritario de la señal basal en las células de ratón. Esta intensa señal basal del ADN satélite principal puede ser debida a la presencia de abundantes lugares lábiles alcalinos constitutivos en esta secuencia.

**B) Respecto a la discriminación de ssb y dsb en el ADN mediante DBD-FISH:**

3. La técnica DBD-FISH en cometas neutros permite la estima simultánea y fácil de las roturas de cadena doble y sencilla en el mismo núcleo, célula a célula.
  - Las ssb se correlacionan con la intensidad de la señal de DBD-FISH.
  - Las dsb se correlacionan con la migración observada en la señal de DBD-FISH.

**C) Respecto a la técnica DBD-FISH junto con SCGE en dos dimensiones:**

4. La migración del ADNcs tras la segunda electroforesis alcalina (Electroforesis neutra-desnaturalización alcalina-90° Electroforesis alcalina), se va haciendo progresivamente **mayor** y más homogénea, moviéndose desde la cabeza a la cola del cometa obtenido en la primera electroforesis. Debido a las condiciones desnaturalizantes, la longitud de ADNcs aumenta con el tiempo y estos tramos de ADNcs tienden a no interactuar entre ellos, facilitándose su movilidad.
5. En el caso de la segunda electroforesis neutra (Electroforesis neutra-desnaturalización alcalina-90° Electroforesis neutra), la migración del ADNcs se va haciendo progresivamente **menor** y más homogénea,

moviéndose desde la cabeza a la cola del cometa obtenido en la primera electroforesis. En este caso, las condiciones de pH permiten la renaturalización parcial del ADNcs generado durante el paso previo de desnaturalización. Por lo tanto, bajo estas condiciones, los fragmentos de ADNcs se entrelazarían, dando lugar a una menor libertad de migración, que se va acentuando según nos acercamos a la cola.

6. Cuando el ADN se moviliza sin ninguna desnaturalización (Electroforesis neutra-90° Electroforesis neutra), en su conformación de doble cadena, se observa que durante la segunda electroforesis, el ADN de la cabeza del cometa inicial no migra. Además, los cometas parecen estar formados por fibras de ADN, que tienden a doblarse en ángulos rectos desde un punto variable de la cola, reflejando probablemente el lugar dónde se encontraba el extremo de la fibra cuando se movió en dirección perpendicular.

**D) Respecto a la estructura de las ITRS el daño inducido por rayos X y su reparación, en células de hámster chino:**

7. Los bloques de ITRS presentan una elevada sensibilidad a la desnaturalización alcalina, que correlaciona con la hipersensibilidad a la digestión “in situ” con la nucleasa mung bean. Posiblemente las ITRS poseen una estructura cromatínica particular, enriquecida en pequeños segmentos de ADN sin emparejar.
8. Tras la exposición a rayos X las ssb y dsb fueron inducidas con densidad similar tanto en las ITRS como en el genoma total.
9. La cinética de reparación de las ssb en las ITRS fue similar a la del genoma total. La ausencia de actividad ADN-PKcs no afecta a dicha cinética.
10. Sin embargo, la tasa de reparación de dsb, estudiada por la longitud de migración relativa de la señal de DBD-FISH, fue inicialmente más lenta en las ITRS que en el genoma total, en las células control. La estructura

diferencial de la cromatina podría dar lugar a una heterogeneidad intragenómica en la cinética de reparación de las dsb radioinducidas.

11. En ausencia de actividad ADN-PKcs (mutantes XR-C1 y XR-C2), la tasa de reparación de dsb en el genoma total aparece más lenta que en las células control. Sin embargo, la tasa de reparación de dsb en las ITRS no se modificó con respecto al control. De este modo, la actividad ADN-PKcs parece no afectar a la cinética de reparación de dsb presentes en las ITRS. Este resultado indica que las vías de reparación de dsb pueden operar diferencialmente en regiones específicas del genoma.



# ***Bibliografía***

- Ahnström, G. (1988). Techniques to measure DNA strand breaks in cells: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 695-707.
- Ahnström, G. and Edvardsson, K.A. (1974). Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxyapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation. *International Journal of Radiation Biology* **26**, 493-497.
- Ahnström, G. and Erixon, K. (1973). Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxyapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation. *Int. J. Radiat. Biol.* **36**, 197-199.
- Ahnström, G. and Erixon, K. (1981). The measurement of strand breaks by DNA unwinding in alkali and hydroxyapatite chromatography. DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures, Edited by P.C. Hanawalt and E.C. Friedberg (New York: Marcel Dekker), 403-418.
- Alvarez, L., Evans, J.W., Wilks, R., Lucas, J.N., Brown, J.M., Giaccia, A.J. (1993). Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites. *Genes Chromosomes Cancer* **8**, 8-14.
- Atamna, H., Cheung, I., Ames, B.N. (2000). A method for detecting abasic sites in living cells: age dependent changes in base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 686-691.
- Azzalin, C.M., Mucciolo, E., Bertoni, L., Giulotto, E. (1997). Fluorescence in situ hybridization with a synthetic (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> polynucleotide detects several intrachromosomal telomere-like repeats on human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **78**, 112-5.
- Azzalin, C.M., Nergadze, S.G., Giulotto, E. (2001). Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma* **110**, 75-82.
- Baiget, M., Gallano, P., Tizzano, E. (1995). Técnicas de biología molecular. Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular. Ed. SEQC.
- Balajee, A.S., Dominguez, I., Bohr, V.A., Natarajan, A.T. (1996). Immunofluorescent analysis of the organization of telomeric DNA sequences and their involvement in chromosomal aberrations in hamster cells. *Mutat Res.* **372**, 163-72.

- Balajee, A.S., Oh, H.J., Natarajan, A.T. (1994). Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat Res.* **307**, 307-13.
- Barsky, D., Foloppe, N., Ahmadi, S., Wilson 3<sup>rd</sup> D.M, MacKerell Jr., A.D. (2000). New insights into the structure of abasic DNA from molecular dynamic situations. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2613-2626.
- Beauchamp, R.S., Mitchell, A.R., Buckland, R.A., Bostock, C.J. (1979). Specific arrangements of human satellite III. DNA sequences in human chromosomes. *Cromosoma* **71**, 153-66.
- Bertoni, L., Attolini, C., Faravelli, M., Simi, S., Giulotto, E. (1996). Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster. *Mamm. Genome* **7**, 853-855.
- Bertoni, L., Attolini, C., Tessera, L., Mucciolo, E., Giulotto, E. (1994). Telomeric and nontelomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in gene amplification and chromosome stability. *Genomics* **24**, 53-62.
- Blocher, D. (1988). DNA double-strand break repair determines the RBE of alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 761-71.
- Bostock, C.J., Gosden, J.R., Mitchell, A.R. (1978). Localisation of a male-specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome. *Nature* **272**, 324-8.
- Bouffler, S., Silver, A., Papworth, D., Coates, J., Cox, R. (1993). Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome 2 fragile sites. *Genes Chromosomes Cancer* **2**, 98-106.
- Bouffler, S.D. (1998). Involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **404**, 199-204.
- Bradley, M.O., and Kohn, K.W. (1979). X ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Research* **131**, 19-26.
- Broccoli, D., Miller, O.J., Miller, D.A. (1990). Relationship of mouse minor satellite DNA to centromere activity. *Cytogenet Cell Genet.* **54**, 182-6.
- Bruner, S.D., Norman, D.P., Verdine, G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* **403**, 859-66.

- Bunch, R., Gewirtz, D.A., and Povirk, L.F. (1992). A Combined alkaline unwinding / southern blotting assay for measuring low levels of cellular DNA breakage within specific genomic regions. *Oncology Research* **4**, 7-15.
- Bunch, R.T., Gewirtz, D.A. Porvik, F. (1995). Ionizing radiation-induced DNA strand breakage and rejoining in specific genomic regions as determined by alkaline unwinding/Southern blotting method. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**, 553-562.
- Burk, R.D., Szabo, P., O'Brien, S., Nash, W.G., Yu, L., Smith, K.D. (1985). Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* **92**, 225-33.
- Buschta-Hedayat, N., Buterin, T., Hess, M.T., Missura, M., Naegeli, H. (1999). Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6090-5.
- Carle, G.F., Frank, M., Olson, M.V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**, 65-68.
- Chaudhry, M.A., Weinfeld, M. (1995). The action of Escherichia coli endonuclease III on multiply damaged sites in DNA. *J. Mol. Biol.* **249**, 914-22.
- Chu, G. (1991). Bag model for DNA migration during pulsed-field electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci* **88**, 11071-11075.
- Chu, G., Vollrath, D., Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* **234**, 1582-1585.
- Collins K. (2000). Mammalian telomeres and telomerase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 378-83. Review.
- Cooke, H. (1976). Repeated sequence specific to human males. *Nature* **262**, 182-6.
- Cooke, H.J., Hindley, J. (1979). Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **6**, 3177-97.
- Cooke, H.J., Schmidtke, J., Gosden, J.R. (1982). Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma* **87**, 491-502.
- Corneo, G., Ginelli, E., Zardi, L. (1973). Satellite and repeated sequences in human DNA. Modern aspects of cytogenetics: constitutive heterochromatin in man. In: Pfeiffer RA (ed). Schattauer, Stuttgart.
- Dahm-Daphi, J., Sab, C., Alberti, W. (2000). Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 67-75.



- Darroudi, F., Fomina, J., Meijers, M., Ntarajan, A.T. (1998). Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat. Res.* **404**, 55-65.
- Darzynkiewicz, Z. (1994). Acid-induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure. *Methods Cell Biol.* **41**, 527-541.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Carter, S.P., Higgins, P.J. (1987). In situ factors affecting stability of the DNA helix in interphase nuclei and metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* **1**, 168-179.
- Das, B.C. (1988). Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. *Crit. Rev. Toxicol.* **19**, 43-86.
- David-Cordonnier, M.H., Laval, J., O'Neill, P. (2000). Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and Escherichia coli Nth and Fpg proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 11865-73.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R., West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol. Cell.* **7**, 273-82.
- Desmaze, C., Alberti, C., Martins, L., Pottier, G., Sprung, C.N., Murnane, J. P., Sabatier, L. (1999). The influence of interstitial telomeric sequences on chromosome instability in human cell. *Cytogenet. Cell Genet.* **86**, 288-295.
- Devilee, P., Slagboom, P., Cornelisse, C.J., Pearson, P.L. (1986). Sequence heterogeneity within the human alphoid repetitive DNA family. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2059-73.
- Dianov, G.L., O'Neill, P., Goodhead, D.T. (2001). Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA. *BioEssays* **23**, 745-749.
- Durfy, S.J., Willard, H.F. (1987). Molecular analysis of a polymorphic domain of alpha satellite from the human X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **41**, 391-401.
- Essers, J., van Steeg, H., de Wit, J., Swagemakers, S.M., Vermeij, M., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. (2000). Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J.* **19**, 1703-10.
- Evans, E.P. (1981). Karyotype of the house mouse. *Symp. Zool. Soc. London* **47**, 127-139.

- Fairbain, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* **339**, 37-59.
- Fairbain, D.W., Reyes, W.A., O'Neill, K.L. (1994). Alkali-labile sites are prevalent in kidney tissue DNA. *Cancer Lett.* **81**, 67-76.
- Fangman, W.L. (1978). Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **5**, 653-665.
- Faravelli, M., Azzalin, C.M., Bertoni, L., Chernova, O., Attolini, C., Mondello, C., Giulotto, E. (2002). Molecular organization of internal telomeric sequences in Chinese hamster chromosomes. *Gene* **283**, 11-16.
- Faravelli, M., Moralli, D., Bertoni, L., Attolini, C., Chernova, O., Raimondi, E., Giulotto, E. (1998). Two extended arrays of a satellite DNA sequence at the centromere and at the short-arm telomere of Chinese hamster chromosome 5, *Cytogenet. Cell Genet.* **83**, 281-286.
- Fernández, J.L., Gosálvez J., Goyanes, V. (1995). High frequency of mutagen-induced chromatid exchanges at interstitial telomere-like DNA sequence blocks of Chinese hamster cells. *Chromosome Res.* **3**, 281-284.
- Fernández, J.L., Goyanes, V.J., Ramiro-Díaz, J., Gosálvez, J. (1998). Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet. Cell. Genet.* **82**, 251-256.
- Fernández, J.L., Valverde, D., Goyanes, V., Buño, I., Gosálvez, J. (1997). Alu I *in situ* digestion of human alphoid and classical satellite DNA regions. High-resolution digital image analysis of FISH signals from condensed and extended chromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* **76**, 94-100.
- Fernández, J.L., Vázquez-Gundín, F., Delgado, A., Goyanes, V.J., Ramiro-Díaz, J., de la Torre, J., Gosálvez, J. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat. Res.* **453**, 77-82.
- Fernández, J.L., Vázquez-Gundín, F., Rivero, M.T., Genescà, A., Gosálvez, J., Goyanes, V. (2001a). DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of single- and double-strand breaks in individual cells. *Exp. Cell Res.* **270**, 102-109.
- Fernández, J.L., Vázquez-Gundín, F., Rivero, M.T., Goyanes, V., Gosálvez, J. (2001b). Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH. *Mutat. Res.* **473**, 163-168.

- Fertil, B., Modak, S., Chavaudra, N., Debry, H., Meyer, F., Malaise, E.P.(1984). Detection in situ of  $\gamma$ -ray induced DNA strand breaks in single cells: enzymatic labeling of free 3'-OH ends. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **46**, 529-540.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995). DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington DC.
- Frommer, M., Prosser, J., Vincent, P.C. (1984). Human satellite I sequences include a male specific 2.47 kb tandemly repeated unit containing one Alu family member per repeat. *Nucleic Acids Res.* **12**, 2887-900.
- Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D.T., Alt, F.W. (1998). A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity* **9**, 367-376.
- Godthelp, B.C., Wiegant, W.W., van Duijn-Goedhart, A., Scharer, O.D., van Buul, P.P., Kanaar, R., Zdzienicka, M.Z. (2002). Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2172-2182.
- Goodhead, D.T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7-17. Review.
- Goodhead, D.T., Thacker, J., Cox, R. (1993). Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**, 543-56. Review.
- Gosálvez, J., de la Torre, J., Lopez-Fernández, C., Fernandez, J.L. (2002). The combined use of nuclease in situ digestion and FISH (NU-FISH) in: B. Rautenstrauss, T. Liehr (Ed.), FISH technology-Springer lab manual, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Gosálvez, J., Lopez-Fernández, C., García de la Vega, C., Mezzanotte, R., Fernández, J.L., Goyanes, V. (1993). Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease III. *Genome* **36**, 230-234.
- Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Buckland, R.A., Clayton, R.P., Evans, H.J. (1975). The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. *Exp. Cell Res.* **92**, 148-158.



- Gravholt, C.H., Friedrich, U., Caprani, M., Jørgensen, A.L. (1992). Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **14**, 924-930.
- Gray, K.M., White, J.W., Costanzi, C., Gillespie, D., Schroeder, W.T., Calabretta, B., Saunders, G.F. (1985). Recent amplification of an alpha satellite DNA in humans. *Nucleic Acids Res.* **3**, 521-35.
- Haber, J.E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet.* **16**, 259-264. Review.
- Hanai, R., Yazu, M., Hieda, K. (1998). On the experimental distinction between ssbs and dsbs in circular DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 475-9.
- Harrison, L., Hatahet, Z., Wallace, S.S. (1999). In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites. *J. Mol. Biol.* **290**, 667-84.
- Hastie, N.D., Allshire, R.C. (1989). Human telomeres: fusion and interstitial sites *Trends Genet.* **5**, 326-331. Review.
- Higgins, M.J., Wang, H.S., Shtromas, I., Haliotis, T., Roder, J.C., Holden, J.J., White, B.N. (1985). Organization of a repetitive human 1.8 kb KpnI sequence localized in the heterochromatin of chromosome 15. *Chromosoma* **93**, 77-86.
- Hittelman, W.N., Rao, P.N. (1974). Premature chromosome condensation. 1. Visualization of X-ray-induced chromosome damage in interphase cells. *Mutat. Res.* **23**, 251-258.
- Hoeijmakers, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. (2001). *Nature* **411**, 366-74. Review.
- Hood, L., Campbell, J.H., Elgin, S.C.R. (1975). The organization, expression, and evolution of antibody genes and other multigene families. *Annu. Rev. Genet.* **9**, 305-353.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W. (1999). Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* **284**, 958-61.
- Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., Chen, D.J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.* **14**, 2807-12.



- Jabs, E.W., Goble, C.A., Cutting, G.R. (1989). Macromolecular organization of human centromeric regions reveals high-frequency, polymorphic macro DNA repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **86**, 202-6.
- Jeanpierre, M., Weil, D., Gallano, P., Creau-Goldberg, N., Junien, C. (1985). The organization of two related subfamilies of a human tandemly repeated DNA is chromosome specific. *Hum. Genet.* **70**, 302-10.
- Jeanpierre, M. (1994). Human satellite 2 and 3. *Ann. Genet.* **37**, 163-171.
- Johson, R.T., Rao, P.N. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* **226**, 717-719.
- Jones, K.W., Purdom, I.F., Prosser, J., Corneo, G. (1974). The chromosomal localization of human satellite DNA I. *Chromosoma* **49**, 161-171.
- Jones, R.S., Potter, S.S. (1985). Characterization of cloned human alphoid satellite with an unusual monomeric construction: evidence for enrichment in HeLa small polydisperse circular DNA. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1027-42.
- Jorgensen, A.L., Bostock, C.J., Bak, A.L. (1986). Chromosome-specific subfamilies within human alphoid repetitive DNA. *J. Mol. Biol.* **187**, 185-96.
- Joseph, A., Mitchell, A.R., Miller, O.J. (1989) The organization of the mouse satellite DNA at centromeres. *Exp Cell Res.* **183**, 494-500.
- Juan, G., Pan, W., Darzynkiewicz, Z. (1996). DNA segments sensitive to single-strand-specific nucleases are present in chromatin of mitotic cells. *Exp. Cell Res.* **2**, 197-202.
- Kanter, P.M. and Schwartz, H.S. (1982). A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. *Molecular Pharmacology* **22**, 154-151.
- Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 144-150.
- Kato, H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BudR-labeling method. *Int. Rev. Cytol.* **49**, 55-97.
- Kemp, L.M., Sedgwick, S.G., Jeggo, P.A. (1984). X-Ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat. Res.* **132**, 189-196.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001). DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 247-254. Review.

- Kilburn, A. E., Shea, M. J., Sargent, R. G., Wilson, J. H. (2001). Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability, *Mol. Cell Biol.* **21**, 126-135.
- Kingma, P.S., Greider, C.A., Osherooff, N. (1997). Spontaneous DNA lesions poison human topoisomerase II alpha and stimulate cleavage proximal to leukemic 11q23 breakpoints. *Biochemistry* **36**, 5934-5935.
- Kipling, D., Ackford, H.E., Talyor, B.A. and Cooke, H.J. (1991). Mouse Minor Satellite DNA Genetically Maps to the Centromere and is Physically Linked to the Proximal Telomere. *Genomics* **11**, 235-241.
- Kiyama, R., Matsui, H., Oishi, M. (1986). A repetitive DNA family (Sau3A family) in human chromosomes: extrachromosomal DNA and DNA polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **83**, 4665-9.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygre, J., Ahnström, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Res.* **363**, 89-96.
- Kodym, R., Hörth, E. (1995). Determination of radiation-induced DNA strand breaks in individual cells by non-radioactive labelling of 3'OH ends. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**, 133-139.
- Kohn, K.W. and Grimeg-Ewig, R.A. (1973). Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Research* **33**, 1849-1853.
- Kohn, K.W., Ewig, R.A.G., Erickson, L.C., Zwelling, L.A. (1981). Measurement of strand breaks and cross links by alkaline elution. *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, Edited by P.C. Hanawalt and E.C. Friedberg (New York: Marcel Dekker), 379-401.
- Komatsu, K., Kubota, N., Gallo, M., Okumura, Y., Lieber, M.R. (1995). The scid factor on human chromosome 8 restores V(D)J recombination in addition to double-strand break repair. *Cancer Res.* **55**, 1774-1779.
- Krisch, R.E., Flick, M.B., Trumbore, C.N. (1991). Radiation chemical mechanisms of single- and double-strand break formation in irradiated SV40 DNA. *Radiat. Res.* **126**, 251-9.
- Kunkel, L.M., Smith, K.D., Boyer, S.H. (1979). Organization and heterogeneity of sequences within a repeating unit of human Y chromosome deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **18**, 3343-53.

- Kunkel, T.A. (1984). Mutational specificity of depurination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1494-1498.
- Le Page, F., Kwoh, E.E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S.A., Sarasin, A., Cooper, P.K. (2000). Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* **101**, 159-71.
- Legault, J. Tremblay, A., Mirault, M.E. (1997). Preferential localization of DNA damage induced by depurination and bleomycin in a plasmid containing a scaffold-associated region. *Biochem. Cell Biol.* **4**, 375.
- Lewin, B. (1997). Genes VI. Oxford University Press, Oxford.
- Lindahl, T., Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* **286**, 1897-1905.
- Liu, P. K., Ciu, J., Moore, N., Huang, D. (2002). The in situ detection of apurinic/apyrimidinic sites and DNA breaks bearing extension blocking termini, in: V. Didenko (Ed.), *Methods Mol. Biol.*, Humana Press, Houston.
- Machara, Y., Anai, H., Kusumoto, T., Sakaguchi, Y., Sugimachi, K. (1989). Nick Translation Detection in situ of cellular DNA strand break induced by radiation. *A. J. Pathol.* **134**, 7-10.
- Maio, J.J., Brown, F.L., Musich, P.R. (1981). Toward a molecular paleontology of primate genomes. I. The HindIII and EcoRI dimer families of alphoid DNAs. *Chromosoma* **83**, 103-25.
- Manuelidis, L. (1978). Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* **66**, 23-32.
- McGrath, R.A., Williams, R.W. (1966). Reconstruction in vivo of irradiated E. coli deoxyribonucleic acid; The rejoining of broken pieces. *Nature* **212**, 534-535.
- McKay, R.D., Bobrow, M., Cooke, H.J. (1978). The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* **21**, 19-32.
- McKelvey-Martin, V.J., Ho, E.T.S., McKeown, S.R., Johnston, S.R., McCarthy P.J., Rajab, N.F., Downes, C.S. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* **13**, 1-8.



- Meyne, J., Baker, R.J., Hobart, H.H., Hsu, T.C., Ryder, O.A., Ward, O.G., Wiley, J.E., Wurster-Hill, D.H., Yates, T.L., Moyzis, R.K. (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* **99**, 3-10.
- Miller, O.J., Drayna, D., Goodfellow, P. (1984). Report of the Committee on the Genetic Constitution of the X and Y Chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **37**, 176-204. Review.
- Milligan, J.R., Aguilera, J.A., Nguyen, T.T., Paglinawan, R.A., Ward, J.F. (2000). DNA strand-break yields after post-irradiation incubation with base excision repair endonucleases implicate hydroxyl radical pairs in double-strand break formation. *Int. J. Radiat Biol.* **76**, 1475-83.
- Mitchell, A.R., Beauchamp, R.S., Bostock, C.J. (1979). A study of sequence homologies in four satellite DNAs of man. *J. Mol. Biol.* **135**, 127-149.
- Mitchell, A.R., Gosden, J.R., Miller, D.A. (1985). A cloned sequence, p82H, of the alphoid repeated DNA family found at the centromeres of all human chromosomes. *Chromosoma* **92**, 369-77.
- Moens, P.B., Pearlman, R.E. (1990). Telomere and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* **100**, 8-14.
- Mol, C.D., Parikh, S.S., Putnam, C.D., Lo, T.P., Tainer, J.A. (1999). DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 101-28. Review.
- Moyzis, R.K., Albright, K.L., Bartholdi, M.F., Cram, L.S., Deaven, L.L., Hildebrand, C.E., Joste, E.N., Longmire, J.L., Meyne, J., Schwarzscher-Robinson, T. (1987). Human chromosome-specific repetitive DNA sequences: novel markers for genetic analysis. *Chromosoma* **95**, 375-386.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **85**, 6622-6626.
- Muriel L., Segrelles, E., Goyanes, V., Gosálvez, J., Fernández, J.L. (2004). Structure of human sperm DNA and background damage, analyzed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. *Molecular Human Reproduction* **10**, 203-209.



- Nakamura, J., Walker, V.E., Upton, P.B., Chiang, S.Y., Kow, Y.W., Swenberg, J.A. (1998). Highly sensitive apurinic/apirimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res.* **58**, 222-225.
- Natarajan, A.T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res.* **504**, 3-16.
- O'Neill, P. and Fielden, E.M. (1993). Primary radical process in DNA. *Adv. Radiat. Biol.* **17**, 53-120.
- Obe, G., Johannes, C. Schulte-Frohlinde, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* **7**, 3-12.
- Okumura, K., Kiyama, R., Oishi, M. (1987). Sequence analyses of extrachromosomal Sau3A and related family DNA: analysis of recombination in the excision event. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7477-89.
- Olive, P.L. (1989). Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat. Res.* **117**, 79-92.
- Olive, P.L. (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 395-405.
- Olive, P.L. and Banáth, J.P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and  $^{125}\text{I}$ dUrd. *Int. J. Radiat. Biol.* **4**, 349-358.
- Olive, P.L. and Johnston, P.J. (1997). DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization. *Oncol. Res.* **9**, 287-294.
- Olive, P.L., Wlodek, D., Banáth, J.P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* **51**, 4671-4676.
- Östling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.
- Otterlei, M., Kavli, B., Standal, R., Skjelbred, C., Bharati, S., Krokan, H.E. (2000). Repair of chromosomal abasic sites in vivo involves at least three different repair pathways. *EMBO J.* **19**, 5542-5551.

- Pandita, T.K. and DeRubeis, D. (1995). Spontaneous amplification of interstitial telomeric bands in Chinese hamster ovary cells. *Cytogenet. Cell Genet.* **68**, 95-101.
- Passarge, E. (1979). Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am. J. Hum. Genet.* **31**, 106-115.
- Paul, C.R., Wallace, J.C., Alderfer, J.L., Box, H.C. (1988). Radiation chemistry of d(TpApCpG) in oxygenated solution. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 403-15.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* **10**, 886-95.
- Petrini, J.H. (2000). The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 293-6. Review.
- Pietras, K-F., Bennett, K.L., Siracusa, L.D., Wood-worth-Gutai, M., Chapman, V.M., Gross, K-W., Kane-Haas, C., Hastie, N.D. (1983). Construction of a small *Mus musculus* repetitive DNA library: Identification of a new satellite sequence in *Mus musculus*. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6965-6983.
- Prise, K.M., Ahnstrom, G., Belli, M., Carlsson, J., Frankenberg, D., Kiefer, J., Lobrich, M., Michael, B.D., Nygren, J., Simone, G., Stenerlow, B. (1998). A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 173-184. Review.
- Prise, K.M., Pullar, C.H., Michael, B.D. (1999). A study of endonuclease III-sensitive sites in irradiated DNA: detection of alpha-particle-induced oxidative damage. *Carcinogenesis* **20**, 905-9.
- Prosser, J., Frommer, M., Paul, C., Vincent, P.C. (1986). Sequence relationships of three human satellite DNA. *J. Mol. Biol.* **187**, 145-155.
- Rivero, M.T., Mosquera, A., Goyanes, V., Slijepcevic, P., Fernández, J.L. (2004). Differences in repair profiles of interstitial telomeric sites between normal and DNA double-strand break repair deficient Chinese hamster cells. *Exp. Cell Res.* **295**, 161-172.
- Ross, G.M., Eady, J.J., Mithal, N.P., Bush, C., Steel, G.G., Jeggo, P.A., McMillan, T.J. (1995). DNA strand break rejoining defect in *xrs-6* is complemented by transfection with the human *Ku80* gene. *Cancer Res.* **55**, 1235-1238.

- Rothmann, K. and Löbrich, M. (1999). Misrejoining of DNA double-strand breaks in primary and transformed human and rodent cells: A comparison between the HPRT region and other genomic locations. *Mutat. Res.* **433**, 193-205.
- Roti Roti, J.L. and Wright, W.D. (1987). Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Cytometry* **8**, 461-467.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1998). ATM: from gene to function. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1555-63. Review.
- Rydberg, B. (1975). The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Radiat. Res.* **61**, 274-287.
- Rydberg, B. (2001). Radiation-induced DNA damage and chromatin structure. Acta Oncológica, Taylor and Francis. ISSN 0284-186X.
- Rydberg, B. and Johansson, K.J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. DNA Repair Mechanisms. Edited by P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and F.C. Fox, New York. Academic Press, 465-468.
- Santos, S.J., Singh, N.P., Natarajan, A.T. (1997). Fluorescence *in situ* hybridization with comets. *Exp. Cell Res.* **232**, 407-411.
- Sarkaria, J.N., Bush, C., Eady, J.J., Peacock, J.H., Steel, G.G., Yarnold, J.R. (1998). Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiat. Res.* **150**, 17-22.
- Schaaper, R.M., Kunkel, T.A., Loeb, L.A. (1982). Depurination of DNA as a possible mutagenic pathway for cells. *Basic Life Sci.* **20**, 199-211.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.
- Scully, R. and Livingston, D.M. (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**, 429-432.
- Shapiro, R. Damage to DNA caused by hydrolysis. (1981). Plenum Publishing Corp., New York.
- Sheridan, R.B. and Huang, P.C. (1977). Single strand breakage and repair in eukaryotic DNA as assayed by S1 nuclease. *Nucleic Acids Research* **4**, 299-318.
- Shmookler, R.J., Srivastava, A., Beranek, D.T., Goldstein, S. (1985). Human alphoid family of tandemly repeated DNA. Sequence of cloned tetrameric fragments and analysis of familial divergence. *J. Mol. Biol.* **186**, 31-41.



- Simi, S., Attolini, C., Giulotto, E. (1998). Intrachromosomal telomeric repeats and stabilization of truncated chromosomes in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **397**, 229-233.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* **175**, 184-91.
- Singh, N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., McCoy, M.T., Collins, G.D., Schneider E.L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites DNA of human and mouse sperm. *Exp. Cell Res.* **184**, 461-470.
- Singh, N.P., Stephens, R.E. (1997). Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Res.* **383**, 167-175.
- Singh, N., Smith, C., Szabó, P., Tang, M., Thomale, J., Tornaletti, S., Ugozzoli, L., Van Der Luift, R., Van Houten, B., van Orsouw, N., Vijg, J., Wallace, R., Wallace, S., Walsh, D., Weinfeld, M., Yakes, M. (1996). Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations. Ed Pfeifer, G. Plenum Publishing Corporation.
- Slijepcevic P., Xiao Y., Dominguez I., Natarajan A.T. (1996). Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites. *Chromosoma* **104**, 596-604.
- Slijepcevic, P., Bryant, P.E. (1995). Absence of terminal telomeric FISH signals in chromosomes from immortal Chinese hamster cells. *Cytogenet. Cell Genet.* **69**, 87-89.
- Slijepcevic, P., Xiao, Y., Natarajan, A.T., Bryant, P.E. (1997). Instability of CHO chromosomes containing interstitial telomeric sequences originating from Chinese hamster chromosome 10. *Cytogenet. Cell Genet.* **76**, 58-60.
- Smith, K.D., Young, K.E., Talbot, C.C. Jr, Schmeckpeper, B.J. (1987). Repeated DNA of the human Y chromosome. *Development* **101**, 77-92.
- Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y.M., Morrison, C., Takeda, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 8388-8394.
- Strachan, T., Read, A.P. (1999). Human Molecular Genetics 2. Organization of the human genome. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C



- protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **2**, 223-32.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **15**, 507-21.
- Sumner, A.T. (1990). Chromosome banding, Unwin Hyman, London.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **17**, 5497-5508.
- Tang, J.Y., Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., Chu, G. (2000). Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol. Cell* **5**, 737-44.
- Taylor, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics* **43**, 515-529.
- Teoule, R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **51**, 573-89.
- Therman, E. and Susman, M. (1992) Human Chromosomes. Structure, behavior and effects. Springer-Verlag.
- Thomas, E.A. and Thomas, C.A. Jr. (1989). Nucleoid halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells. *Exp. Cell. Res.* **183**, 149-158.
- Tornaletti, S. and Hanawalt, P.C. (1999). Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie.* **81**, 139-46. Review.
- Tyler-Smith, C. and Willard, H.F. (1993). Mammalian chromosome structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 390-397.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, H.J., Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 196-206.
- Vázquez-Gundín, F., Rivero, M.T., Fernández, J.L. (2002). Radiation-induced DNA breaks in different human satellite DNA sequence areas, analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Radiat. Res.* **157**, 711-720.

- Vázquez-Gundín, F., Gosálvez, J., de la Torre, J., Fernández J.L. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH): effect of unwinding time. *Mutat. Res.* **453**, 83-88.
- Verma, R.S. and Babu, A. (1995) Human Chromosomes: principles and techniques, 2<sup>nd</sup> edition, McGraw-Hill, Inc.
- Vissel, B. and Choo, K.H. (1989). Mouse major ( $\gamma$ ) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between nonhomologous chromosomes. *Genomics* **5**, 407-414.
- Visvardis, E.E., Tassiou, A.M., Piperakis, S.M. (1987). Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\gamma$ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* **383**, 71-80.
- von Sonntag, C. (1987). The chemical basis of radiation biology. Taylor and Francis Ltd. London.
- Wachsberger, P.R., Li, W.H. Guo, M., Chen, D., Cheong, N., Ling, C.C., Li, G., Iliakis, G. (1999). Rejoining of DNA double-strand breaks in Ku80-deficient mouse fibroblasts. *Radiat. Res.* **151**, 398-407.
- Wallace, S.S. (1988). Detection and repair of DNA base damages produced by ionizing radiation. *Environ. Mol. Mutagen.* **12**, 431-477.
- Wallrath, L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**, 147-153
- Wang, H., Zeng, Z.C., Bui, T.A., DiBiase, S.J., Qin, W., Xia, F., Powell, S.N., Iliakis, G. (2001a). Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2, *Cancer Res.* **61**, 270-277.
- Wang, H., Zeng, Z.C., Bui, T.A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Iliakis, G. (2001b). Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* **20**, 2212-2224.
- Ward, J.F. (1985). Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res. Suppl.* **8**, 103-11.
- Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95-125. Review.

- Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M., Caldecott, K.W. (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* **104**, 107-17.
- Willard, H.F. (1985). Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 524-32.
- Willard, H.F. and Waye, J.S. (1987). Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends. Genet.* **3**, 192-198.
- Wong, A.K. and Rattner, J.B. (1988). Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res.* **16**, 11645-61.
- Wong, A.K., Biddle, F.G., Rattner, J.B. (1990). The chromosomal distribution of the major and minor satellite is not conserved in the genus *Mus*. *Chromosoma* **99**, 190-5.
- Wu, J.C., Manuelidis, L. (1980). Sequence definition and organization of a human repeated DNA. *J. Mol. Biol.* **142**, 363-86.
- Wyatt, M.D., Allan, J.M., Lau, A.Y., Ellenberger, T.E., Samson, L.D. (1999). 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. *Bioessays* **21**, 668-76. Review.
- Zakian, V.A. (1995). Telomeres: Beginning to Understand the End. *Science* **270**, 1601-1607.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* **408**, 433-9. Review.
- Zhu, C.M., Bogue, M.A., Lim, D.S., Hasty, P., Roth, D.B. (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* **86**, 379-389.

